Série E
N° d'ordre :
68

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

## LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

**Paul REISS**

Agrégé de Physique biologique
à la Faculté de Médecine de Strasbourg

---

**1re THÈSE.** — L'action du potentiel d'oxydation-réduction du milieu sur l'activité de différentes protéinases : hydrolyse et condensation.

**2e THÈSE.** — Propositions données par la faculté.

**Soutenues le** **1942, devant la Commission d'Examen.**

MM. E. F. TERROINE, *Président.*
A. KIRRMANN, R. BONNET } *Examinateurs*

---

CLERMONT-FERRAND
IMPRIMERIE GÉNÉRALE, J. DE BUSSAC
2, Cours Sablon

1942

Série E
N° d'ordre :
68

# THÈSES

PRÉSENTÉES

# A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

## LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

**Paul REISS**

Agrégé de Physique biologique
à la Faculté de Médecine de Strasbourg

---

**1re THÈSE.** — L'action du potentiel d'oxydation-réduction du milieu sur l'activité de différentes protéinases : hydrolyse et condensation.

**2e THÈSE.** — Propositions données par la faculté.

**Soutenues le** **1942, devant la Commission d'Examen.**

MM. E. F. TERROINE, *Président.*
A. KIRRMANN, R. BONNET } *Examinateurs*

---

CLERMONT-FERRAND
IMPRIMERIE GÉNÉRALE, J. DE BUSSAC
2, Cours Sablon

1942

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

*Doyen* :

M. A. DANJON, professeur d'Astronomie.

*Doyen honoraire* :

E. BATAILLON.

*Professeurs honoraires* :

E. CHATTON, E. ESCLANGON, M. FRECHET, H. GAULT, M. GIGNOUX, L. HACKSPILL, C. HOUARD, E. de MARGERIE, G. RIBAUD, R. THIRY, E. TOPSENT, G. VALIRON, H. VILLAT.

*Professeurs* :

| | |
|---|---|
| H. OLLIVIER. ..... | Physique générale. |
| E. TERROINE..... | Physiologie générale. |
| J. de LAPPARENT .. | Minéralogie et Pétrographie. |
| G. DUBOIS..... | Géologie et Paléontologie. |
| P. de BEAUCHAMP... | Zoologie et Anatomie comparée. |
| L. BOUNOURE..... | Biologie générale. |
| R. ROMANN. . ..... | Chimie générale et Chimie physique. |
| G. FOEX..... | Physique expérimentale. |
| A. KIRRMANN..... | Chimie organique. |
| H. WEISS..... | Physico-chimie des hydrocarbures. |
| L. NEEL. ..... | Physique générale. |
| G. HUGEL ..... | Chimie du pétrole. |
| R. HOCART..... | Minéralogie. |
| A. ROUSSEL. ..... | Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions. |
| R. BONNET..... | Physique et Chimie biologiques. |
| A. CHRETIEN ..... | Chimie minérale. |
| J. MARESQUELLE. . | Botanique. |
| H. FORESTIER. . .... | Chimie. |
| N..... | Botanique. |
| N..... | Mécanique rationnelle. |
| N..... | Chimie générale. |
| N..... | Analyse supérieure. |
| N..... | Physique du Globe. |
| N..... | Mathématiques générales. |

*Maîtres de conférences* :

| | |
|---|---|
| J. ROTHE ..... | Physique du Globe. |
| Ch. SADRON. ..... | Physique générale. |
| Ph. L'HERITIER. ... | Zoologie. |
| J. YVON. ..... | Physique mathématique. |
| L. CAGNIARD. ..... | Physique du Globe. |
| A. HEE. ..... | Botanique. |
| E. WOLFF. ..... | Biologie générale. |
| Ch. EHRESMANN. . . | Mathématiques. |
| Cl. CHABAUTY..... | Mathématiques générales. |
| N..... | Chimie appliquée. |

*Secrétaire* :

E. MARANDON.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOUIN

*Qui a éveillé en nous le goût de la recherche et qui n'a cessé de s'intéresser à nos travaux*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VLÈS

*Qui nous a initié dans la recherche physico-chimique et nous a toujours guidé en nous faisant profiter de son vaste savoir.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR TERROINE

*Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543517_0053

*... hypotheses non fingo... In hac philosophia (philosophia experimentali) propositiones deducuntur ex phaenomenis, et redduntur generales per inductionem.*

I. NEWTON, Philosophiae Naturalis Principia Mathematica, lib. III, sect. I.

# INTRODUCTION

## Le problème posé.

On connaît l'influence de l'acidité actuelle du milieu sur l'activité de la plupart des systèmes fermentaires. Le plus souvent, cette influence peut se traduire par un optimum très net dans une courbe donnant l'intensité de l'action en fonction du pH, toutes autres conditions restant inchangées autant que possible. Si le pH paraît ainsi jouer un rôle important, il est logique d'examiner le rôle éventuel d'autres variables, caractéristiques physico-chimiques du milieu. On se rappellera à ce sujet que Vlès (1935) a pu écrire une équation aux différentielles exactes totales pour la variation d'un phénomène Z

$$dZ = \frac{\partial Z}{\partial pH} dpH + \frac{\partial Z}{\partial rH} drH + \frac{\partial Z}{\partial pX} dpX$$

attribuant ainsi à l'acidité actuelle, à l'équilibre d'oxydation-réduction et à la massivité du milieu des rôles comparables entre eux ou au moins du même ordre dans l'action du milieu sur un phénomène quelconque.

Une activité fermentaire nous a spécialement intéressé de ce point de vue : c'est celle des protéinases. Elle semble en effet extrêmement variable dans l'organisme vivant et notamment à l'intérieur des cellules, tantôt lente ou nulle, tantôt très intense, tantôt destructrice, tantôt synthétisante et sans qu'on démêle une modification notable du système enzyme-substrat expliquant cette variabilité. Mais ne s'agirait-il pas d'une influence du milieu physico-chimique sur le même système fermentaire qui serait ainsi tour à tour activé ou inhibé, orienté vers la lyse ou la condensation des molécules de substratum ?

On arrive à se demander si une influence du potentiel d'oxydation-réduction du milieu existe dans ce sens. Mais, avant 1935, la bibliographie ne fournit pas de démonstration expérimentale directe d'une telle influence. Différentes données signalées par les auteurs à l'occasion de travaux sur l'activation des ferments la font cependant entrevoir (1). Déjà, dans sa thèse en 1895 et de nouveau en 1899, Palladin signale que l'anaérobiose favorise l'hydrolyse des albumines par les ferments végétaux.

Ultérieurement, les auteurs remarquent que certaines substances activent les ferments protéolytiques et une rapide revue bibliographique montrera que très souvent les activateurs sont des corps réducteurs. Il est très caractéristique que Grassmann, Dyckerhoff et von Schoenebeck (1930) notent que le glutathion active la protéolyse catepsique, mais qu'il n'agit qu'à l'état réduit. De même la cystine et la cystéine agissent différemment sur les protéolyses diastasiques. En étudiant l'arginase, Salaskin et Solowjew (1931) remarquent l'accélération de son activité par la cystéine. Nous reviendrons ultérieurement sur le rôle important que paraissent jouer dans la protéolyse les corps à groupement SH libre. En explorant systématiquement la protéolyse de différents tissus animaux Krebs (1931) constate une action inhibitrice de divers métaux sauf si ces métaux se trouvent sous la forme de composés réducteurs : ainsi le chlorure stanneux et le sulfate ferreux peuvent intensifier de 80% la protéolyse ; d'autres réducteurs se comportent de la même façon, alors que des oxydants tels que le ferricyanure de K et l'iode inhibent la protéolyse.

Deux substances notamment, réductrices toutes les deux, se distinguent en activant la presque totalité des réactions enzymatiques examinées : le glutathion réduit ou la cystéine et l'acide ascorbique. Waldschmidt-Leitz et Grassmann (1931) considèrent le glutathion réduit comme l'activateur naturel des protéinases catepsiques d'origine animale. Purr (1935) établit la même conception pour les protéinases végétales et notamment la papaïne après que Grassmann, Schoenebeck et Eibeler eurent montré que la kinase naturelle de la protéinase de levure est le glutathion réduit. Sur la trypsine par contre, la cystéine, le glutathion réduit et $H^2S$ agissent diffé-

(1) Nous ne donnons ici qu'une bibliographie sommaire pour montrer la genèse des problèmes posés. Les travaux ayant trait spécialement aux systèmes protéolytiques que nous avons explorés, sont exposés dans les chapitres correspondants en tant qu'ils intéressent les phénomènes que nous avons étudiés. Nous nous excusons que les circonstances ne nous aient pas permis d'explorer complètement la littérature.

remment et plutôt dans le sens d'une inhibition. A première vue les activations et inhibitions que nous étudions ne semblent donc exister que pour des ferments intracellulaires. La protéolyse tissulaire globale se comporte encore dans le sens d'une activation par les réducteurs et d'une inhibition par les oxydants. C'est ce que constatent Krebs (1931) et Rondoni et Pozzi (1933) en examinant la protéolyse des tumeurs. Csonka (1938) retrouve le même effet avec d'autres tissus. Sawano (1938) signale l'activation de la catepsine extraite d'un Protozoaire par le glutathion et la cystéine, ainsi que par le cyanure. Notons en passant que le glutathion réduit active également l'uréase (Sumner et Poland, 1933), les amylases pancréatique et végétale (Pringsheim, Borchardt et Hupfer, 1932), la glyoxalase (Jowett et Quastel, 1933), la phosphatase (Roche, 1941), l'apozymase (Wagner-Jauregg et Moller, 1935), certaines hémolysines (Cohen, Shakman et Perkins, 1937), la cérébrosidase et le lysozome du blanc d'œuf (Hellerman, 1937 et la lipase (Hopkins et Morgan, 1938). L'activation et l'inactivation réversible de tous ces ferments est interprétée comme étant due à l'existence, dans le ferment actif, d'un groupement —SH indispensable pour l'activité enzymatique. L'inactivation résulterait de l'oxydation de la forme thiol en disulfide.

Nous pouvons encore étendre l'importance de la présence des groupements -SH pour l'activité des enzymes si nous nous rappelons que deux substances, inhibiteurs bien connus de beaucoup d'actions enzymatiques bien que n'étant pas des oxydants, à savoir l'acide monoiodacétique et l'acide maléique, bloquent les groupements -SH (Dickens, Rapkine, Morgan et Friedmann). Leur action serait donc l'équivalent d'une oxydation des thiols.

Le rôle de l'acide ascorbique a été comparé et même assimilé à celui d'un coenzyme. Euler, Karrer et Zehender (1934) étudient l'activation de la catepsine par l'acide ascorbique, Maschmann (1934) celles de la papaïne et de la broméline, Purr (1934) celle de l'amylase animale. D'après Purr (1935), ce rôle revient en réalité à un complexe ferreux de l'acide ascorbique qui d'après Holtz (1937) est même indispensable pour la désamination fermentaire de l'histidine. Pour Pantschenko, Jurewicz et Kraut (1936), l'acide ascorbique est un constituant intégrant de l'estérase hépatique.

Cependant, le rôle du glutathion ou de la cystéine, aussi bien que celui de l'acide ascorbique ont pu être interprétés autrement que par leurs propriétés réductrices : on sait en effet que des traces de métaux lourds peuvent inhiber les ac-

tions enzymatiques les plus variées. Les corps envisagés interviendraient éventuellement en précipitant ces métaux sous forme de complexes inactifs (Krebs, 1931, et Euler, Karrer et Zehender, 1934). L'analyse des expériences fait cependant penser plutôt à la nature réductrice des activateurs comme explication de leur intervention.

A part la présence d'oxydants ou de réducteurs, la tension d'$O^2$ dans le milieu joue également. Ainsi la protéolyse des tissus tumoraux *in vitro* se trouve favorisée par une diminution de la tension d'$O^2$ d'après Voegtlin et Maver (1932) qui rappellent dans leur travail une observation similaire de Palladin.

Des observations de ce genre se retrouvent encore dans les travaux d'autres auteurs sans que cependant aucun d'entre eux ait fait la tentative de relier l'action des oxydants et des réducteurs à la notion de potentiel d'oxydation-réduction du milieu qui aurait pu permettre de saisir le mécanisme des actions observées et d'en faire une étude systématique.

En absence de données expérimentales précises et de mesures de potentiel d'oxydation-réduction correspondant à l'activation et à l'inactivation des ferments protéolytiques, Wurmser (1932) attire cependant l'attention sur la signification et l'importance obligatoire des potentiels d'oxydation-réduction pour les réactions enzymatiques.

Parallèlement, de nombreux essais ont été faits pour obtenir la réversion du processus enzymatique d'hydrolyse. Nous relaterons ces essais dans un autre chapitre : il apparaît que des conditions d'aération et autres, c'est-à-dire des conditions d'oxydation-réduction, sont considérées comme essentielles. Alors que les processus d'hydrolyse semblent exiger la présence de corps réduits, les synthèses sont considérées comme des réactions se faisant en milieu oxydé.

Mothes (1933) présente le problème du déterminisme des hydrolyses et synthèses protidiques sous un aspect à la fois plus physiologique et plus général en étudiant la régulation du métabolisme de l'azote chez les végétaux. Il remarque qu'une plante peut présenter alternativement et même simultanément des organes avec prédominance soit de l'hydrolyse soit de la synthèse (par exemple les graines dans différents stades de leur évolution : germination, maturation . L'intervention de l'eau suivant la loi des masses pourrait jouer : l'hydrolyse se manifeste au moment de l'imbibition de la graine sèche, la synthèse au moment de la dessiccation accompagnant la maturation. Mais le plus souvent la quantité d'eau en présence n'est pas décisive : on note de l'hydrolyse dans les feuil-

les au cours de la fanaison. La concentration moléculaire totale n'est pas plus importante. Mais d'autres modifications du milieu semblent pouvoir agir sur l'équilibre entre les hydrolyses et les synthèses dans le tissu vivant : l'oignon peut présenter des synthèses au début de la germination ; une large aération des tissus les favorise ; l'anaérobiose l'inhibe. Par l'action d'un vide préalable, on arrive à infiltrer dans le parenchyme des feuilles vertes des solutions contenant des hydrolysats de protéines ; les feuilles les utilisent pour la synthèse dans des conditions d'aération et d'oxydation soigneusement maintenues. Dans les feuilles vertes l'hydrolyse protidique domine normalement la nuit, la synthèse le jour ; on peut cependant renverser cette règle : des feuilles placées la nuit dans l'oxygène pur ne montrent pas d'hydrolyse, celle-ci s'installe d'autre part le jour dans une atmosphère privée de $CO^2$, c'est-à-dire ne permettant pas la photo-synthèse génératrice d'oxygène au sein des tissus. Tous ces faits concordent parfaitement et Mothes en arrive à se demander si ce n'est pas l'oxydation-réduction qui détermine le sens de l'action des enzymes protéolytiques : prédominance de l'hydrolyse ou synthèse. Aucune mesure de potentiel cependant n'apporte de confirmation à l'hypothèse de Mothes.

D'autres faits dispersés dans la littérature viennent encore stimuler l'observateur dont l'attention est désormais attirée vers le problème posé par Wurmser du point de vue théorique et par Mothes du point de vue physiologique. La protéolyse d'une globuline végétale par une catepsine extraite de graines de *Vicia sativa* est inhibée par aération énergique du milieu ou par addition de petites quantités de $H^2O^2$ (Blagowestschenski et Korman, 1934) ; il est vrai que ces auteurs observent également une inhibition par la cystéine. En étudiant la panification, Joergensen (1935) constate que celle-ci s'accomplit mal si dans la pâte une activité protéolytique trop considérable s'installe. L'addition de traces de $BrO^3K$ et d'autres oxydants à la pâte améliore la panification, l'addition de glutathion réduit la gêne. Joergensen suppose que le bromate et le glutathion interviennent par leur action sur la protéolyse. Effectivement de faibles additions de $BrO^3K$, $JO^3K$, $S^2O^8(NH^4)^2$ et de $BO^3Na$ inhibent l'action protéolytique de la papaïne et de la broméline (extraite de l'ananas) sur la gélatine ; $ClO^3K$ est sans action, comme d'ailleurs aussi sur la panification. L'action des ferments protéolytiques du malt et du germe de blé sur la gélatine est modifiée de la même façon. L'acide ascorbique intensifie les protéolyses étudiées. Elion confirme que certains améliorants de la panification sont des oxydants et inhibent les protéidases végétales.

Au moment où ces intéressantes recherches paraissaient, apportant de nouveaux faits concernant l'action des oxydants et des réducteurs sur les activités des ferments protéolytiques, nous nous étions proposé de chercher si ces actions de corps chimiques si divers ne pouvaient pas être rapportées à une variable unique, le potentiel d'oxydation-réduction. Nous cherchions à combler la lacune de la littérature, l'absence complète de mesures expérimentales de tels potentiels dans les milieux comportant une action enzymatique en présence d'oxydants ou de réducteurs. Nous cherchions un système protéolytique permettant l'étude d'un aussi grand nombre que possible d'oxydants et de réducteurs et la mesure des potentiels obtenus. Des expériences faites sur la protéolyse de la gélatine par la papaïne se sont révélées favorables et l'action d'un grand nombre de substances a pu être explorée (1935). Nous donnerons ultérieurement le détail des résultats obtenus. Nous avons pu conclure que le potentiel d'oxydation-réduction est une variable décisive pour le fonctionnement des ferments protéolytiques et nous avons apporté les premières données numériques à ce sujet.

Cependant, des données sur l'activation ou l'inhibition des activités protéolytiques sans mesures de potentiel sont encore publiées. Orechowitsch (1936) observe que la digestion de la gélatine par des extraits de Têtards normaux ou en régénération est activée par $SH^2$ et la cystéine. Cette activation est variable suivant les conditions. $SH^2$ active également la catepsine de l'œuf de Poule incubé (Goldstein et Gintsbourg, 1937). Maschmann (1938) étudie l'activité protéolytique d'un filtrat de culture de *Bacillus perfringens* ; elle est accentuée par la cystéine et le glutathion réduit. Dans un travail suivant (1939), ces résultats sont étendus par l'étude de l'action des acides thiolactique, thiobutyrique, thiomalique et ascorbique et du sulfite de Na qui tous peuvent remplacer la cystéine dans l'activation de dipeptidases extraites de plusieurs espèces microbiennes. L'acide thioglycolique agit dans le même sens, mais faiblement, bien que Mirsky et Anson considèrent ce corps comme le réducteur le plus efficace des groupements -S-S protidiques ; l'acide thiolactique est sans action. L'auteur en conclut que l'activation n'est pas due à la réduction de groupements -S-S- du ferment, mais à l'établissement d'un potentiel d'oxydation-réduction déterminé, favorable à son activité lytique. Karrer et Straus (1938) ayant étudié l'activation d'une catepsine par des dérivés de dihydropyridine concluent que le rôle de ces substances pourrait être la fixation d'un niveau d'oxydation-réduction adéquat ; les réducteurs naturels seraient cependant plus actifs que des produits

chimiques n'existant pas normalement dans l'organisme vivant. Berger et Johnson (1940) montrent que des dipeptidases de différentes origines exigent pour atteindre le maximum d'activité un complexe d'un sel métallique réducteur (Fe ou Mn bivalents) et de cystéine, glutathion réduit ou acide thioglycolique.

A partir de 1938, nous avons étendu le résultat obtenu sur la papaïne à toute une série de systèmes protéolytiques et quelques notes préliminaires ont fixé les jalons de ces recherches. La notion de l'activation de ferments de type catepsine par les réducteurs et leur inhibition par les oxydants était suffisamment établie et admise ces dernières années pour que ces actions aient pu servir à caractériser la présence d'une catepsine dans un complexe protéolytique (Fruton et Bergmann, 1939).

Nous nous sommes attaché à montrer que cette action de produits chimiques variés sur certains ferments ne tient qu'à l'établissement d'un potentiel d'oxydation-réduction défini, hypothèse qui, à la suite de nos premières notes, avait été adoptée par Bersin (1939) dans son traité didactique d'enzymologie. Nous avons été amené à nous demander si, dans l'échelle des potentiels d'oxydation-réduction, on ne trouverait pas des courbes d'activité (à optimum, par exemple) analogues à celles connues dans la gamme des pH ; ou, en d'autres mots, nous avons cherché à étudier la variable potentiel d'oxydation-réduction pour l'activité des protéinases comme on avait étudié la variable pH.

Pour donner une portée plus générale aux premiers résultats que nous avions obtenus, il importait de les étendre à un certain nombre de protéinases. Voici quelques considérations qui nous ont guidé dans leur choix. Les ferments protéolytiques les mieux connus sont les ferments digestifs du tractus intestinal des animaux supérieurs ; on les prépare à l'état pur, même cristallisés, et ils agissent sur des substances bien définies, voire synthétiques, dans des conditions faciles à préciser. Mais, au moins *in vivo,* aucune régulation de l'équilibre d'oxydation-réduction du milieu ne semble intervenir. Il y avait donc peu de chances que nous trouvions là une action du potentiel d'oxydation-réduction du milieu. Quelques expériences exposées plus loin ont d'ailleurs confirmé cette prévision. Les conditions sont radicalement différentes pour les protéinases intracellulaires. On doit les tenir pour responsables de l'augmentation de la matière vivante azotée au cours de la croissance de la cellule ainsi que de l'élaboration de certains produits de sécrétion. D'autre part, la possibilité d'une action lytique a été bien établie.

Pour les végétaux, Gorup-Besanez a montré, dès 1874, la présence de ferments protéolytiques dans plusieurs graines ; Green a caractérisé une action trypsique dans des tissus de jeunes plantules en 1887. On peut admettre aujourd'hui la présence ubiquitaire de ces protéinases intracellulaires. Il en est de même pour les cellules animales après les premières recherches de Mesnil (1901), définissant une « actinoprotéase » dans les cellules des Actinies, celles de Mouton (1902) extrayant d'amibes un ferment de type trypsique et après de très nombreuses publications mettant en évidence des protéinases dans les leucocytes (Achalme, 1899) et ensuite dans tous les tissus examinés.

Il doit donc y avoir dans toutes les cellules vivantes un système enzymatique (peut-être complexe) qui réalise soit la synthèse soit la lyse des protéines. Son activité semble être orientée dans un sens ou dans l'autre par les conditions physiologiques ou celles de l'expérimentation *in vitro*. Il n'était pas absurde de penser que les équilibres d'oxydation-réduction intervenaient dans cette orientation. C'est à la suite de ce raisonnement que nous avons étudié l'action du potentiel d'oxydation-réduction du milieu sur les protéinases intracellulaires.

## TECHNIQUE

### Choix des ferments.

Etant donné la répartition absolument générale des protéïnases intracellulaires dans les règnes végétal et animal nous avons choisi les systèmes étudiés et notamment leur provenance d'après les considérations suivantes : nous nous sommes adressé à des tissus qui présentent par leur physiologie normale des synthèses et éventuellement des lyses actives de matière azotée. Dans cette idée, nous avons étudié les graines végétales au sein desquelles se produisent des remaniements importants des protéines au cours de la germination. Nous avons utilisé des tissus de l'Arénicole qui présente, d'une part, une fonte physiologique en hiver et, d'autre part, une croissance très rapide si les conditions alimentaires sont favorables. Les Actinies peuvent également présenter des fontes tissulaires ou au contraire une croissance rapide. Pour les tissus d'animaux supérieurs, on sait que dans la rate s'opèrent à la fois des destructions et des proliférations cellulaires s'accompagnant probablement de remaniements de protéines dans le sens de la lyse et de la synthèse ; c'est ce qui nous a incité à étendre nos expériences à la pulpe de rate. En général, nous nous sommes adressé de préférence à des animaux jeunes, les transformations de la matière azotée y étant plus intenses que chez les adultes.

Un autre point de vue qui a dirigé notre choix était le souci d'opérer sur un matériel aussi homogène que possible. La paroi musculaire de l'Arénicole, les tissus de l'Actinie ne sont guère favorables en ce sens. Par contre, le cristallin privé de sa capsule, le corps vitré de l'œil ont été choisis en raison de leur homogénéité. Le muscle de poisson, constitué presque exclusivement par des fibres musculaires striées, peut encore être considéré comme un matériel favorable.

Voici d'ailleurs la liste des matériaux ayant fourni les enzymes dans nos expériences. Du règne végétal proviennent la papaïne et différentes graines, dont seule l'Orge a été étudiée à fond. Les animaux inférieurs ont fourni la paroi ectodermique d'une Actinie (*Bunodes equina*) et la paroi musculaire de l'Arénicole. Le muscle de Poissons représente les Vertébrés poïkilothermes. Enfin, le veau nous a fourni le cristallin, le corps vitré, la pulpe de rate et le foie. A titre de comparaison avec les ferments digestifs, nous avons étudié la pepsine.

Sauf en ce qui concerne la papaïne et la pepsine pour lesquelles nous avons utilisé des préparations commerciales ayant déjà subi un début de purification nous avons évité de purifier, voire d'extraire les protéinases et cela pour plusieurs raisons. Pour chercher à obtenir un travail des enzymes analogue à celui qui se fait dans l'organisme, il convenait de modifier aussi peu que possible les conditions de leur fonctionnement. Nous nous sommes efforcé de conserver l'ensemble du complexe enzymatique en le plaçant dans un milieu suffisamment homogène pour que les mesures physico-chimiques y aient un sens et pour que l'addition de réactifs divers n'y pose pas un problème de répartition entre plusieurs phases ou d'équilibre de membrane.

Les essais de purification des ferments par les méthodes courantes risquent de modifier leurs propriétés, même si leur activité est conservée. Peut-être s'agit-il d'un début de dénaturation analogue à celle qu'on a bien étudiée pour différentes protéines et qui altère leurs propriétés sans cependant leur enlever certaines de leurs caractéristiques essentielles. En tout cas, la littérature nous fournit des exemples de modifications des propriétés de ferments par des essais de purification ou autres interventions qui, cependant, n'entament pas leur activité. Ainsi Willstaetter et Waldschmidt-Leitz étudient une lipase du ricin dont l'action a un optimum à pH 5 avec une décroissance très rapide vers les pH élevés au point qu'à pH 6,8 l'activité est nulle ; après passage par un milieu acidifié par HCl, l'activité est maxima à pH 6,8 et très réduite aux pH plus bas, par exemple au tiers à pH 4,7. Willstaetter, Graser et Kuhn montrent que la purification de la saccharase la rend plus électropositive sans cependant modifier le pH optimum. La pepsine brute est un ampholyte avec le point isoélectrique à pH 2 (Michaelis et Davidsohn) ; une préparation purifiée est par contre continuellement négative même dans des milieux très acides (Pekelharing et Ringer). Pour éviter qu'une purification ou simple extraction des enzymes ne modifie éventuellement les pro-

priétés que nous nous proposions d'étudier, nous avons donc utilisé les préparations brutes « totales ».

Non seulement des caractéristiques physico-chimiques, mais encore le comportement biologique des enzymes peut être modifié par leur purification. Ainsi l'invertase est inhibée par les narcotiques dans la cellule vivante ainsi que dans un extrait aqueux de tissus végétaux. Schuermeyer a montré que l'invertase purifiée est insensible à l'action des narcotiques, mais qu'elle retrouve sa sensibilité si l'on ajoute des protéines au milieu. Oparin a insisté longuement sur la portée générale de telles constatations.

---

**Le substrat.**

Le souci de conserver le mieux possible à l'enzyme étudié les conditions de son fonctionnement *in vivo* nous a également imposé le choix du substrat. Il nous a semblé que le substratum normal de l'enzyme, c'est-à-dire l'ensemble des protides au contact desquels il se trouve à l'origine dans le tissu vivant, devait être celui qui lui permettrait d'exercer son activité dans les conditions les plus physiologiques et peut-être aussi de l'exercer avec un maximum d'efficacité. Différentes recherches confirment cette dernière hypothèse. Fisher fait agir des extraits de plantes séchées sur diverses protéines ; l'activité la plus forte s'observe quand la protéinase et la protéine proviennent de la même espèce végétale (action d'un extrait de poudre de Pois sur la légumine). Rondoni préconise l'autoprotéolyse comme meilleur procédé d'investigation des ferments protéolytiques tissulaires. Goldstein montre que la catepsine digère mieux les protéines provenant de son tissu d'origine (foie, rein, muscle) que la gélatine, par exemple. Goldstein et Gintsbourg signalent que les protéines de l'œuf de Poule sont mieux digérées par la catepsine extraite de l'embryon de poulet que par des catepsines extraites de tissus de Mammifères.

Fournir à chaque enzyme son substratum naturel extrait et purifié ne semble pas encore suffisant pour assurer les meilleures conditions de fonctionnement. Soustraire au contraire aussi peu que possible du milieu naturel revient à conserver éventuellement des coenzymes, des cosubstrats, des activateurs, etc. Behrens et Bergmann ont en effet montré que l'action de la papaïne sur la glycine-anilide ou la glycyl-*l*-leucine est plus efficace en présence d'un troisième corps, dit cosub-

strat parce qu'il sert de substrat intermédiaire nécessaire pour l'attaque du substrat même tout en se retrouvant à peu près intact à la fin du processus. Il peut même y avoir intérêt à laisser subsister des actions enzymatiques concomitantes ne portant pas sur les protides : Rubel montre sur des tranches de tissus *in vitro* que la protéolyse est plus active dans des conditions telles qu'une glycolyse énergique peut se poursuivre ; la protéolyse dans des tranches de foie, de cortico-surrénale et de tumeurs varie du simple au double suivant qu'on inhibe la glycolyse par FNa ou qu'on l'entretient par des additions de glucose au milieu. En plus les extraits bruts sur lesquels nous opérons doivent contenir des stabilisateurs du potentiel d'oxydation-réduction qui seront précieux pour empêcher de trop fortes variations de potentiel en cours d'expérience. Ces variations ne semblent en effet pas toujours attribuables à des réactions secondaires de corps qu'une purification judicieuse éliminerait, mais souvent à des réactions du substratum même au cours de la lyse.

Dans le but de n'enlever au milieu naturel rien qui pourrait favoriser l'action des protéinases par des mécanismes généralement mal connus nous avons donc étudié l'autolyse protéique dans des extraits aqueux totaux de différents tissus sans aucun fractionnement. Si, à la suite, nous parlons des « systèmes protéasiques » ou encore des « systèmes protéolytiques » de l'Orge, du foie, de la pulpe de rate, etc..., nous entendons désigner par là l'ensemble des protéinases et s'il y a lieu des polypeptidases et autres ferments protidasiques avec leurs coferments éventuels, d'une part, des protides et surtout des protéines normalement présents dans le tissu d'origine des ferments accompagnés des cosubstrats éventuels, d'autre part, bref le milieu cellulaire aussi complet que possible. Il est évident que dans un tel milieu d'autres systèmes enzymatiques que celui que nous envisageons existent et exerceront leur activité simultanément. Dans certains cas, cette activité peut être gênante : nous avons dû abandonner les expériences sur certaines graines en raison de l'acidification trop forte produite au cours de l'autolyse par des réactions fermentaires concomitantes et qui faisait trop varier les conditions physico-chimiques du milieu pour la protéolyse au cours même d'une expérience.

Dans d'autres cas, nous avons, au contraire, été placé dans des conditions presqu'idéales de pureté du système protéasique employé. Nous voulons parler du cristallin et du corps vitré. Il s'agit là de systèmes déjà presqu'homogènes au départ, ne présentant pas d'inclusion figurée et ne contenant que fort peu de substances en dehors des protéines. On imagine difficilement des préparations plus parfaites dans lesquelles figurent,

d'une part, tous les activateurs, etc., d'autre part, un minimum de corps étrangers, indifférents ou nuisibles, au processus étudié.

Pour la pepsine et la papaïne, nous avons fait abstraction du principe de faire agir chaque enzyme sur son substratum naturel complet. La pepsine, en effet, n'agit pas, normalement, dans un milieu intracellulaire bien défini et constant, mais au contraire sur n'importe quelle protéine. Elle ne se trouve donc pas dans des conditions anormales en agissant sur la gélatine. Pour la papaïne, son rôle dans le fruit de *Carica papaya* semble peu connu et nous ignorons même si elle y présente normalement une certaine activité. En plus, nous ne disposions pas de fruits, mais seulement de préparations commerciales de papaïne. Comme, d'autre part, les conditions de son activation sont bien connues, nous avons cru pouvoir l'utiliser avec de la gélatine comme substrat et les résultats obtenus ont justifié ce choix.

---

**Technique de l'autolyse.**

Voici en gros la technique que nous avons utilisée. Le tissu frais est broyé aussi finement que possible (éventuellement avec du sable), mis en suspension dans 4 à 10 volumes de sérum physiologique, centrifugé et additionné de toluène. Dans une première série d'expériences, on détermine l'optimum de pH de la protéolyse qui s'effectue à l'étuve à 37°-40°. Les échantillons sont amenés au pH voulu à l'aide de l'électrode à antimoine montée en différentiel (Vlès). L'intensité de la protéolyse est appréciée par la formoltitration des groupements $-NH^2$ libérés. Une fois l'optimum de pH établi, nous amenons systématiquement les extraits de tissus à ce pH pour étudier l'influence du potentiel d'oxydation-réduction. Si la zone de l'activité de l'enzyme le permet, des séries parallèles sont faites à des pH voisins.

Différents points de notre technique d'autolyse — très simple — appellent des commentaires : le broyage simple au mortier des tissus mis en expérience n'aboutit pas à une suspension bien homogène. Nous avions indiqué avec Vellinger une technique de broyage tissulaire, rapide et très poussé, qui consiste à congeler le tissu à la neige carbonique et à le réduire en une poudre fine dans un mortier également refroidi par la détente de gaz carbonique li-

quéfié. Les travaux de F.-F. Nord nous ont empêché d'utiliser cette technique pourtant commode ; cet auteur a en effet décrit sous le vocable de la cryolyse toute une série de modifications de systèmes complexes, enzymatiques entre autres, par le froid. La congélation risquait par conséquent d'altérer nos systèmes protéasiques ce que nous voulions éviter dans la mesure du possible.

Nos manipulations n'ayant malheureusement pas pu être faites à l'abri d'une infection éventuelle, nous avons été obligé d'utiliser des antiseptiques. Les extraits tels que nous les portons à l'étuve sont d'excellents milieux de culture et la moindre infection se traduit à la sortie de l'étuve par une décomposition complète. Du point de vue de la protéolyse, l'action des ferments microbiens produit un effet au moins dix fois plus fort que l'autolyse tissulaire aseptique ; on ne risque donc pas de confondre l'une avec l'autre, d'autant moins que l'infection, si elle se fait, est toujours massive. Nous avons vérifié plusieurs fois par des contrôles bactériologiques que, sauf les cas d'une telle infection massive, nos milieux sont stériles à la sortie de l'étuve. Les antiseptiques qui semblent le moins gêner la protéolyse sont le toluène et le thymol à saturation, FNa à 2% (Effront) et le chloroforme. Nous avons le plus souvent utilisé le toluène à saturation qui a l'avantage de ne pas exiger de dosage et nous a donné satisfaction à condition de l'introduire précocement dans un extrait préparé proprement et de veiller à ce que l'étanchéité du bouchonnage des échantillons empêche son évaporation à l'étuve. Le chloroforme et le thymol que nous avons utilisés dans certains cas se comportent comme le toluène. Nous avons évité le fluorure qui inhibe certaines réactions fermentaires dont l'accomplissement est peut-être utile pour les phénomènes que nous étudions.

On a bien signalé que les antiseptiques altèrent les enzymes protéolytiques, mais, notamment pour le toluène, Effront a montré que cette action est d'autant moins prononcée que la préparation enzymatique est moins pure et plus concentrée. Notre technique nous met donc à l'abri de cet inconvénient.

Les autolyses ont été effectuées le plus souvent à 37°, bien que l'optimum d'action de la plupart des systèmes protéolytiques ne soit atteint qu'à des températures notablement plus élevées (Firdman). Mais, à ces températures, la destruction spontanée des enzymes semble s'accentuer encore plus que leur activité ; nous avions à cœur d'éviter cette destruction étant donné que nous cherchions à la fin de l'autolyse la réversibilité éventuelle du processus et qu'il fallait par conséquent que la lyse s'achevât autant que possible en présence du ferment intact.

### Mesure de l'autolyse.

La méthode choisie pour l'étude quantitative de la protéolyse devait nous permettre de mesurer avec une même précision la scission des molécules de protéine et la condensation éventuelle des fragments obtenus. Il nous a semblé que le dosage des groupements $-NH^2$ ou $-CO^2H$ libérés ou réengagés dans une structure moléculaire offrait dans ce sens plus de garantie que l'étude d'une propriété physique telle que la précipitabilité par des réactifs déterminés. Le dosage de l'azote aminé par la formoltitration nous a paru un procédé de choix. Nous donnons un tableau emprunté à Effront qui montre que la formoltitration permet de suivre les progrès d'une digestion aussi bien que les autres procédés figurant dans ce tableau ; elle a sur eux l'avantage de la rapidité.

TABLEAU I (d'après Effront)

Digestion d'ovalbumine à 2% par la trypsine en présence de toluène.

| Durée | 3 h. | 2 j. | 3 j. | 4 j. | 5 j. | 11 j. | 16 j. | 21 j. | 25 j. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N précipitable par $ZnSO^4$.. | 60,1 | 16,4 | 16,1 | 19,2 | 17,5 | 14, 2 | 12,9 | 6,9 | 6,9 |
| N précipité par l'acide phosphotungstique..... | 17,6 | 26,9 | 23,5 | 21,7 | 19,3 | 20,4 | 21,5 | 24,0 | 24,1 |
| N non précipité par l'acide phosphotungstique..... | 22,3 | 56,7 | 56,7 | 59,1 | 63,2 | 65,4 | 65,6 | 69,1 | 69,0 |
| N aminé dosé par formoltitration ..... | 11,1 | 21,3 | 26,8 | 27,7 | 29,0 | 34,6 | 34,8 | 41,9 | 41,5 |
| N précipité par le tanin.... | 52,8 | 10,1 | 10,7 | 17,0 | 15,5 | 12,8 | 10,8 | 3,2 | 3,0 |

Dans des recherches plus modernes on a pu constater que la quantité des liaisons peptidiques scindées au cours d'une digestion est à la fois caractéristique de l'intensité et de la nature de l'action fermentaire étudiée (Miller).

Le seul dosage des groupements aminés comporte cependant une cause d'erreur très importante provenant d'une désamination éventuelle (Terroine et Lauresco, Neber). Pour contrôler qu'une telle désamination ne fausse pas nos résultats nous avons pratiqué dans certaines séries d'expériences des dosages d'ammoniaque, des dosages d'azote précipitable par

l'acide trichloracétique ou encore des titrations des groupements $CO^2H$ à la thymolsulphonephtaléine. Nous signalerons les résultats à l'endroit voulu : ils ne comportent aucune indication d'erreurs entraînées par la formoltitration.

Il faut cependant préciser un point important : la formoltitration est-elle encore correcte en milieu complexe ? Le dosage des acides aminés par formoltitration (Soerensen) est basé sur l'influence qu'exerce le formol sur la dissociation électrolytique de ces acides. Il apparaît qu'à la suite du blocquage du groupement aminé par le formol le caractère acide s'accentue et devient ainsi plus accessible à un dosage. La méthode de Soerensen consiste à amener la solution à la neutralité au tournesol et à ajouter du formol, neutralisé préalablement. A la suite de cette addition la solution s'acidifie et on titre à la soude jusqu'au virage franc de la phénolphtaléine.

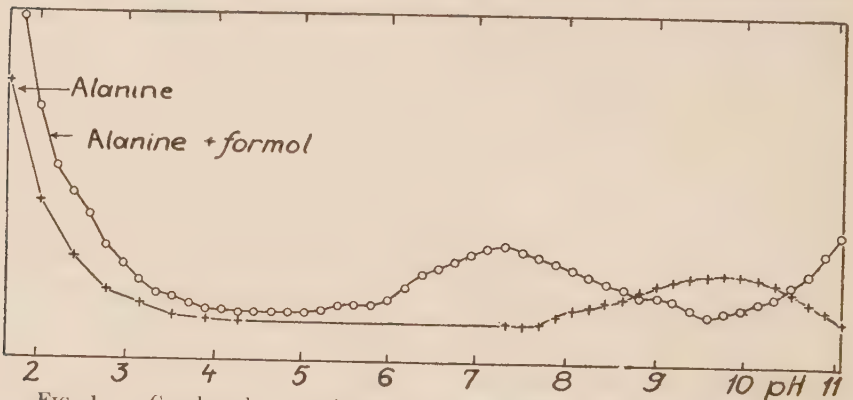


Fig. 1. — Courbes de pouvoir tampon, dans l'échelle des pH, d'une solution d'alanine pure m/10 (+) ou additionnée de formol (o).

Dans la pratique courante on utilise celle-ci seule : on l'amène d'abord au début du virage et ensuite à la fin du virage après addition de formol. Quoiqu'il en soit, il y a toujours un intervalle de pH entre les points finaux de la première et de la deuxième neutralisation et ce fait pourra donner lieu à des causes d'erreur comme nous allons le montrer de suite.

Le *mécanisme de la formoltitration* s'explique par la courbe de neutralisation d'acides aminés avant et après addition de formol. Des études de ce genre ont déjà été faites, notamment par Harris, qui a montré l'abaissement progressif de la constante de dissociation acide $pk_1$ de l'acide. Nous avons fait à l'antimoine les courbes de neutralisation d'une solution d'alanine contenant 225 mg dans 24 $cm^3$ d'eau distillée avant et après addition de formol. Les courbes de pouvoir tampon (fig. 1) dérivées de ces courbes de neutralisation montrent

que l'alanine présente vers pH 10 un maximum de pouvoir tampon qui correspond à la dissociation du groupement acide (pk=9,7, Harris). Après addition de formol cette bande de pouvoir tampon est déplacée vers les pH bas ; cet abaissement du $pk_a$ des acides aminés en présence de formol a été vu et étudié par de nombreux auteurs (Harris ; Dunn et Weiner ; Schmidt (1). Dans notre cas le sommet correspondant au pk vient se placer à pH 7,4. Dans la formoltitration courante on amène donc la solution aux abords de la zone de pouvoir tampon. Par suite de l'acidification et du déplacement simultané de la zone de pouvoir tampon consécutifs à l'addition du formol, on se trouve encore à la marge de la zone de pouvoir tampon qui représente les groupements acides équivalents aux groupements aminés primitivement libres et bloqués par le formol qu'il s'agit de doser. En alcalinisant jusqu'à pH 9 à 10 on aura correctement mesuré le pouvoir tampon en question.

Pour que le dosage puisse se faire avec précision, il faut que la solution ne présente pas un pouvoir tampon supplémentaire notable dans la région comprise entre les deux virages utilisés (pH 7 et 9, par exemple). Ce pouvoir tampon se superposerait en effet à celui résultant du déplacement de la bande du groupement acide ; il serait dosé avec celui-ci et fausserait par excès les résultats de la formoltitration.

Or dans les milieux complexes (extraits de tissus, par exemple) dans lesquels on effectue couramment la formoltitration et que nous avons utilisés dans nos expériences, cette condition (absence de pouvoir tampon supplémentaire) n'est pas réalisée. On trouvera dans la fig. 2 un exemple de courbes de pouvoir tampon d'un extrait aqueux fractionné de foie dans laquelle apparaît un pouvoir tampon assez considérable du milieu initial dans toute la gamme des pH et aussi aux environs de la neutralité. Les courbes se relèvent autour de pH 9 à 10 comme on a l'habitude de le voir dans les milieux protidiques. A la suite de l'addition de formol, ce maximum de pouvoir tampon se déplace pour se situer entre pH 6 et 7. Dans de nombreux extraits que nous avons ainsi étudiés à l'aide de courbes de neutralisation nous avons observé des modifications par le formol comparables à celles que nous venons de décrire dans la solution pure d'un acide aminé ; cependant la bande de pouvoir tampon qui nous intéresse se

(1) Postérieurement à nos expériences, Dubuisson a étudié la courbe de neutralisation de la myosine avant et après addition de formol. Le résumé de son travail donné dans le *Bulletin Analytique*, qui nous a été seul accessible, nous fait supposer que ses résultats sont analogues aux nôtres.

dégage moins nettement. Les points initiaux et finaux de la titration sont moins définis. Il en résulte que la formoltitration aura une précision moindre que dans les solutions d'acides aminés purs. En plus le pouvoir tampon existant aux environs de pH 7 à 8 avant addition de formol introduit une cause d'erreur en ce sens qu'il se superpose à celui qu'on se propose de doser. Nous en concluons que les valeurs absolues de formoltitration sont entachées d'erreur et nous

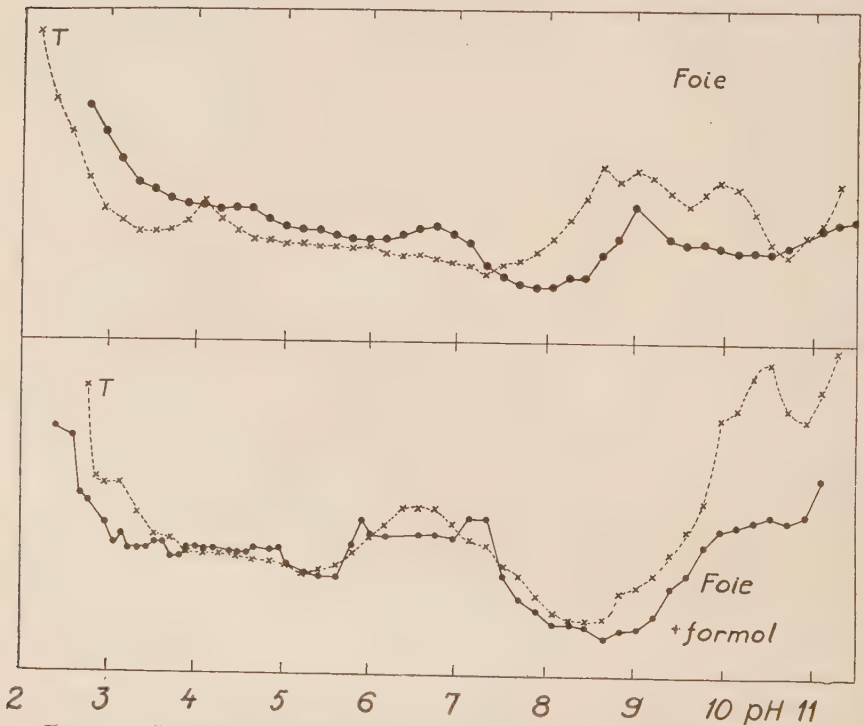


Fig. 2. — Courbes de pouvoir tampon d'extraits de foie purs (en haut) ou additionnés de formol (en bas).
× = témoin, . = lot expérimenté (voir p. 112).

ne baserons pas de raisonnement sur elles. Cependant nos courbes montrent que ce pouvoir tampon des environs de la neutralité ne se modifie pas sensiblement au cours de nos expériences (il doit être dû à des substances comme des électrolytes qui ne subissent pas de digestion) ; les valeurs relatives de nos titrations, les différences entre les dosages avant et après digestion, ne sont donc pas faussées et c'est de celles-ci que nous ferons état.

On peut augmenter la fidélité de la formoltitration sans cependant modifier la valeur absolue des dosages effectués en remplaçant les indicateurs par la mesure des pH à l'antimoine (A. et J. Roche). Le dosage peut ainsi être effectué avec grande précision dans des milieux troubles dans lesquels

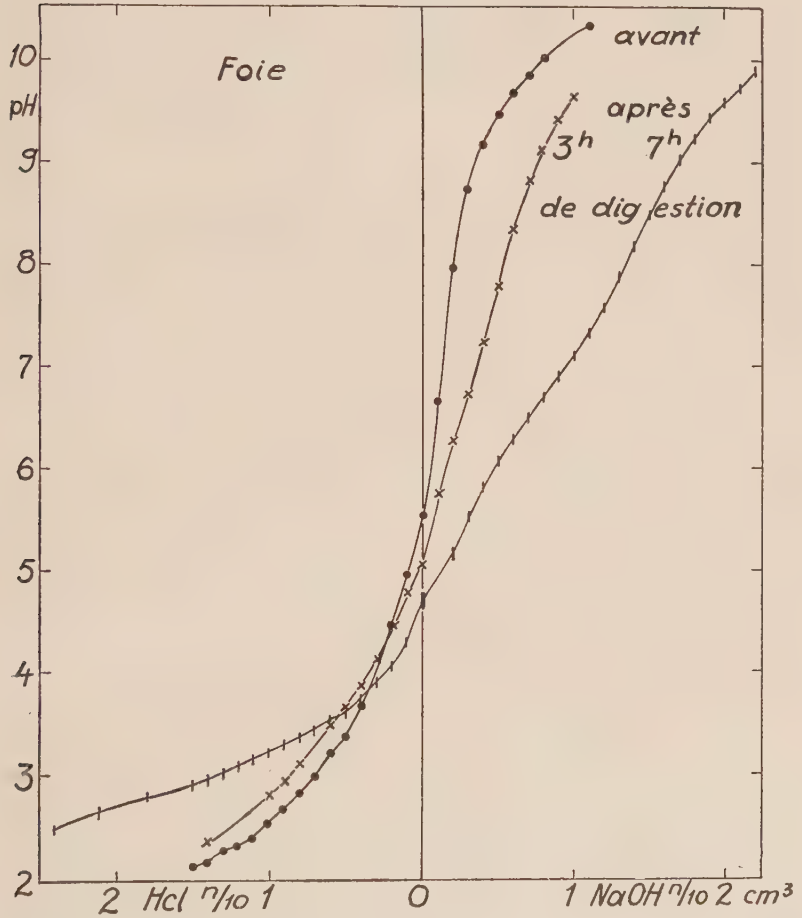


Fig. 3. — Courbes de neutralisation d'un extrait de foie de veau avant autolyse (.) et après 3 heures (×) et 7 heures (|) d'autolyse. En abscisses les quantités d'acide et de soude ajoutées, en ordonnées le pH.

l'appréciation du virage des indicateurs est délicate. A. et J. Roche titrent en amenant le milieu d'abord à pH 7 et ensuite, après addition de formol, à pH 9. Dans les milieux complexes que nous avons utilisés et surtout en raison du pouvoir

tampon existant entre ces deux limites de pH nous avons cru préférable de partir de pH 8 au lieu de 7. Dans ces conditions, l'accord avec le dosage aux indicateurs était satisfaisant.

Etant donné le caractère purement relatif des résultats que nous tirons de la formoltitration nous nous sommes demandé si le dosage direct des valences acides titrables entre pH 8 et 10,5 ne pouvait pas fournir un renseignement équivalent sur la quantité des acides aminés présents, la plupart des $pK_a$ se plaçant dans cette région. Les résultats obtenus dans quelques essais ne se montrent pas supérieurs à ceux obtenus à la formoltitration.

Dans le même ordre d'idées, on peut essayer de pousser plus avant l'analyse des milieux en cherchant à séparer et à doser à part les différentes fonctions dissociables apparaissant par rupture des liaisons peptidiques ou disparaissant par leur formation. On peut mettre à profit en ce sens l'étude de la courbe de neutralisation des mélanges avant et après action du ferment dans l'espoir de révéler une apparition de groupements dissociables par une augmentation du pouvoir tampon dans une zone de pH définie. La fig. 3 montre la modification du pouvoir tampon après une digestion partielle telle que nous l'obtenons par l'autolyse d'un extrait aqueux de foie ainsi qu'après une autolyse poussée. Ces courbes traduisent l'abaissement du pH du milieu et l'augmentation progressive du pouvoir tampon au cours de la digestion. Mais l'augmentation du pouvoir tampon s'étale sur toute la gamme de pH explorée. Bien que le phénomène se manifeste dans certaines régions de pH plus que dans d'autres, aucune n'est suffisamment privilégiée de ce point de vue pour qu'on puisse être tenté de proposer un simple titrage entre deux limites de pH fixes comme mesure de la digestion.

Nous nous sommes d'ailleurs rendu compte que le premier temps de la formoltitration, qui consiste à amener les milieux au début du virage de la phénolphtaléine, réalise une mesure de la digestion. La quantité de soude nécessaire traduit à la fois l'augmentation du pouvoir tampon par libération de groupements dissociables et l'abaissement du pH du milieu au cours de la digestion. Nous avons toujours noté cette quantité de soude. Elle varie parallèlement aux valeurs fournies par la formoltitration. Cependant nous n'en faisons pas état, car dans certains cas les résultats ainsi obtenus paraissent moins fidèles et leur signification théorique est moins bien définie.

On peut envisager d'améliorer les résultats tirés d'un simple titrage si l'on réussit à diminuer la dissociation de certains

groupements au profit de certains autres. De cette idée théorique sont nées des techniques qui chargent le milieu – avant le titrage — de substances telles que éthanol, dioxane, etc., dans lesquels la dissociation électrolytique est affaiblie. Ainsi Willstaetter et Waldschmidt-Leitz d'une part, Harris d'autre part et plus tard Martens, ont mis au point des techniques de titrage en présence d'alcool ; Popovici et Radulescu ont utilisé un éther cyclique, miscible à l'eau, le dioxane ($O(C^2H^4)^2O$), de constante diélectrique 2,2, qui diminue fortement la dissociation électrolytique et permet de mieux dégager les valences dissociables des acides aminés. En pra-

Fig. 4.

Burette à mise au zéro automatique

tique, en présence de 50% de dioxane, on titre les groupements carboxyle à la thymolphtaléine et les groupements aminés au rouge méthyle. Nous avons essayé cette méthode intéressante, mais les résultats obtenus, sur lesquels nous reviendrons, ont été plutôt moins précis que ceux de la formoltitration. La titration dans l'acétone à l'aide du rouge naphtyle a été préconisée par Linderstroem-Lang et par Miller, mais les courbes de neutralisation données par Linderstroem-Lang font supposer qu'en milieux complexe des difficultés analogues à celles que nous avons signalées pour la formoltitration surgiront.

Etant donné le très grand nombre de dosages que nous avons effectués au cours de nos recherches, nous avons mis au point une *burette à mise au zéro automatique* plus simple et plus commode à manier que les modèles qu'on avait signalés auparavant (fig. 4). Il n'y a en effet qu'un seul robinet qui assure à la fois le remplissage de la burette et son utilisation pour la titration. Ce robinet, placé en bas de la burette, comporte trois orifices répartis régulièrement à 120° l'un de l'autre ; le boisseau a une seule perforation en V réunissant deux points de sa périphérie qui sont situés à 120° l'un de l'autre. Ce dispositif permet de mettre la burette en communication soit avec un tube de déversement, soit avec un flacon de Mariotte servant de réservoir pour le liquide. Pour la commodité de la manipulation la clé du robinet porte deux branches orientées comme la perforation du boisseau.

Pour le bon fonctionnement de la burette, il y a lieu de surveiller les détails suivants : le robinet doit être assez gros pour qu'on n'ait pas de fuite quand on le place dans une position intermédiaire en vue de couper toute communication. Pour obtenir une installation correcte du zéro, il y a avantage à utiliser, pour l'arrivée de l'air dans le flacon de Mariotte, un tube large (diamètre intérieur 6 mm.) dont l'extrémité inférieure est recourbée horizontalement et à placer le zéro de la burette dans une partie rétrécie en un tube fin (diamètre intérieur 2 à 3 mm.) ; ainsi les minimes fluctuations du niveau où s'installe le liquide seront négligeables pour la précision du dosage. Pour garantir la fixité du zéro, le flacon de Mariotte est porté par le même support que la burette. Il ne paraît d'ailleurs pas impossible de supprimer les joints en caoutchouc en construisant la burette et son réservoir en une seule pièce ; cette façon de faire serait surtout indiquée pour les microburettes.

Le maniement de la burette est simple. Le réglage du zéro se fait une fois pour toutes en montant ou abaissant le tube d'arrivée d'air du flacon de Mariotte disposé à une hauteur convenable. Ce flacon étant rempli partiellement de liquide et soigneusement bouché, on peut, suivant la position du robinet, soit remplir la burette, soit utiliser son contenu dans une manipulation de titrage, soit vider directement le flacon de Mariotte par le tube d'écoulement de la burette. A la fin d'un titrage on arrête l'écoulement en mettant le robinet en position intermédiaire, et, après lecture de la burette, un seul mouvement du robinet permet de préparer celle-ci pour le titrage suivant en la mettant en communication avec le réservoir.

### Caractéristiques du milieu.

Nous avons imposé aux milieux étudiés des variations de pH et de potentiel d'oxydation-réduction.

Les variations de pH sont obtenues par addition de ClH n et OHNa n sous le contrôle de l'électrode à antimoine montée en différentiel (Vlès). Les variations éventuelles du pH au cours de l'autolyse ont été recherchées un certain nombre de fois par des mesures avant et après le séjour à l'étuve. Elles sont d'un ordre de grandeur sans importance pour le cas présent, en raison du pouvoir tampon élevé des extraits.

Les variations de potentiel sont obtenues par addition de divers réactifs, ou, dans certains cas, en modifiant les conditions d'aération des échantillons. Les réactifs utilisés sont, d'une part, le ferricyanure, l'hypochlorite, le persulfate, le perborate et le chlorate de potassium, l'eau oxygénée (perhydrol neutralisé au moment de l'utilisation) et d'autre part, des colorants réduits, l'hydrosulfite de sodium en solution faiblement alcaline, le chlorure titaneux, le sulfate ferreux, l'acide ascorbique et la métoquinone. Les quantités utilisées sont faibles : on a repéré empiriquement les concentrations approximatives de ces corps qu'il est nécessaire de mettre en œuvre pour réaliser les potentiels voulus. Il s'agit de quantités de l'ordre du mg pour 10 $cm^3$ de milieu. L'agitation énergique à l'air comme moyen d'oxydation a dû être abandonnée, car on sait par de nombreux travaux (voir Effront, p. 173) — et nous l'avons vérifié — que les enzymes peuvent ainsi perdre une partie de leur activité par des mécanismes autres que l'oxydation du milieu.

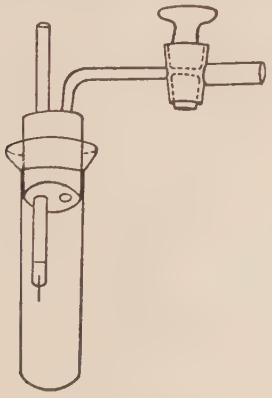

Fig. 5. — Tube à électrode permettant la mesure du potentiel d'oxydation-réduction des milieux en cours d'expérience à l'abri de l'air.

Pour pouvoir suivre les évolutions du potentiel au cours de la digestion tout en laissant les échantillons réduits à l'abri de l'air, nous avons utilisé le dispositif reproduit par la figure 5, à savoir : un tube à essai de 10 $cm^3$ environ fermé par un bouchon de caoutchouc portant une électrode de platine et un tube coudé muni d'un robinet.

Ce dispositif permet de fermer le tube à essai rempli du milieu à étudier sans laisser de bulle d'air et d'établir le contact avec une demi-pile au calomel pour les mesures de potentiel. Ce petit appareil dérive du tube de Thunberg : il est plus simple que celui de Borsook-Wurmser, que nous avons également expérimenté, et s'est montré très maniable et suffisamment étanche à l'air pour nos besoins.

Nous avons suivi l'évolution du potentiel d'oxydation-réduction des milieux en cours d'expériences. Avec certaines substances, le potentiel s'établit vite à une valeur relativement stable, avec d'autres on assiste à une évolution très longue et souvent de grande amplitude. Les milieux réducteurs maintenus dans les tubes à l'abri de l'air sont très stables surtout si le potentiel est tamponné par des colorants. Mais même l'hydrosulfite de Na seul produit des potentiels suffisamment stables. Ainsi nous relevons dans une expérience de digestion de gélatine par la papaïne les mesures suivantes :

| | Potentiel initial | Potentiel final |
|---|---|---|
| Témoin..... | +220 mV | +227 mV |
| + hydrosulfite | +172 | +183 |
| en quantité | —110 | —118 |
| croissante | —390 | —370 |

Dans certains cas, l'autolyse produit des corps réducteurs ou des substances réagissant progressivement avec les oxydants ou les réducteurs introduits. Il en résulte une évolution, variable suivant les expériences, et qui peut parfois être gênante, notamment pour le cristallin dans lequel, après broyage et sans addition d'aucun réactif, une réduction très importante du milieu se manifeste. Cependant, dans la plupart des cas, le potentiel s'installe après quelques heures à un niveau qui se maintient approximativement au cours de la fin de l'autolyse. Les potentiels indiqués, notés en millivolts (mV) par rapport à l'électrode à hydrogène normale, sont

en conséquence toujours les potentiels finaux. Nous n'avons pas voulu réaliser un tampon d'oxydation-réduction en dehors de celui que les milieux possèdent spontanément et de celui que certains de nos réactifs introduisent, afin de modifier aussi peu que possible la composition chimique de nos extraits.

On remarquera que certains des oxydants que nous avons utilisés ne sont pas électroactifs dans le sens donné par Wurmser à ce terme. Il serait donc difficile, dans des milieux purifiés, de définir un potentiel. Mais, dans les milieux complexes que nous avons utilisés, des réactions avec des substances électroactives présentes peuvent s'engager. Nous avons en fait toujours pu mesurer des potentiels de l'électrode de platine se présentant avec des caractéristiques telles (stabilité, reproductibilité et insensibilité à une polarisation de l'électrode) que nous pouvons les considérer comme des potentiels d'oxydation-réduction du milieu.

# ÉTUDE DE DIFFÉRENTS SYSTÈMES PROTÉOLYTIQUES

## Résultats expérimentaux.

### Papaïne.

Historique.

*La protéinase.* La digestion des matières protéiques par les purées de fruits du Papayer (*Carica papaya L.*) était bien connue dans la zone intertropicale de l'Afrique, de l'Amérique et des Indes quand Wurtz a consacré en 1879 la première étude au ferment protéolytique extrait du latex de ce fruit. Un très grand nombre de recherches a été fait sur ce ferment extraordinairement actif et facile à manier. On le connaît actuellement sous forme cristallisée ; il se comporte comme une protéine (Balls, Lineweaver et Thompson, 1937). Le latex contient un système polyfermentaire, dans lequel Bergmann et ses collaborateurs ont pu séparer deux peptidases ; Damodaran et Ananta-Narayanan ont mis en évidence une activité désamidasique se manifestant sur la caséine après une première attaque hydrolytique (1). L'optimum de température de l'activité protéolytique se trouve aux environs de 90°, mais la destruction du ferment est très rapide à cette température. En pratique, et pour des actions un peu prolongées on a intérêt à se placer à 50° environ (Effront). L'optimum de pH dépend du substratum : il est généralement près

(1) Les dosages d'ammoniaque que nous avons effectués dans certaines de nos expériences ne fournissent aucune indication d'une désamination dans nos conditions expérimentales.

du point isoélectrique de celui-ci. Ainsi Willstaetter, Grassmann et Ambros trouvent un optimum à pH 5,5 en utilisant comme substratum la gélatine ($pH_i = 4,8$), à pH 5,5 avec de la peptone d'albumine ($pH_i = 4,8$) et à 7,2 avec de la fibrine ($pH_i = 7,2$).

*Activation.* La papaïne a ceci de particulier qu'elle est activable par le cyanure. D'après Willstaetter et Grassmann, la présence de cyanure peut multiplier l'activité par 2 ou 3 et élargir en même temps la spécificité. Les protéines natives et les peptones ne sont lysées qu'en présence de cyanure, alors que pour l'attaque de la gélatine cette substance n'est pas indispensable. Grassmann, Dyckerhoff et Schoenebeck notent que la même activation peut être obtenue également par la cystéine ou par $SH^2$, mais non par la cystine. Il semble donc y avoir un certain rapport avec l'action des réducteurs que nous avons signalée dans l'introduction. Nos expériences ont confirmé le parallélisme des deux actions et, faisant intervenir des milieux réducteurs, nous avons pu dans certaines expériences nous passer de l'action du cyanure. Il nous paraissait préférable de ne pas introduire du KCy comme activateur d'autant plus que ce corps n'est ni l'activateur naturel ni même un agent indispensable quand on utilise des préparations fraîches complètes de papaïne. Frankel, Maimin et Shapiro signalent en effet que le latex frais du fruit de *Carica papaya* a une activité protéolytique qui n'est pas augmentée par le cyanure, celui-ci ne joue un rôle qu'après les premières interventions de purification (dégraissage, centrifugation, etc.). D'autre part, les solutions brutes de papaïne qui seraient activables, mais qu'on abandonne simplement un certain temps, se comportent — à l'égal des préparations fraîchement extraites des fruits — comme si elles étaient activées (Grassmann, Dyckerhoff et Schoenebeck).

L'activation de la papaïne par les réducteurs apparaît par contre comme un mécanisme essentiel et indispensable. On signale ainsi l'action du glutathion, de l'acide ascorbique et des sels de fer bivalent dans certaines conditions (Maschmann (1934), de la cystéine, des acides citrique et pyruvique et du ferrocyanure (Maschmann et Helmert, 1935), de l'hydrogène sulfuré et du thioglucose (Bergmann et Ross, 1935) ainsi que celle des acides thioglycolique, thiohydracrylique et dithioldiglycolique (Schoeberl et Fischer, 1939). Même le sérum ou le sang total activent la papaïne, cette action étant due aux groupements -SH des protéines (Waldschmidt-Leitz, Conrath et Gloeditsch, 1937). Le mécanisme de l'activation par

l'acide ascorbique est étudié par MASCHMANN et HELMERT (1934) qui mettent en évidence son caractère complexe sans arriver à l'élucider. Parallèlement on a cherché à connaître la nature de l'activateur existant *spontanément* dans le latex frais : GRASSMANN (1935) extrait par l'éthanol à 70% une substance activante qui ne serait pas le glutathion (impossibilité de préparer le sel cuivreux) mais dont l'hydrolyse met en évidence de grandes quantités de cystéine et d'acide glutamique. Cependant pour FRANKEL et MAIMIN (1937) ainsi que pour GANAPATHY et SASTRI (1938) le glutathion, présent dans le latex, serait l'activateur naturel de la papaïne. La coagulation du lait par la papaïne bénéficie des mêmes activations que la protéolyse (BALLS et HOOVER, 1937).

Très en avance sur ces données et ayant constaté que l'activation de la papaïne par $SH^2$, le glutathion ou le sulfite est réversible et peut être annulée par des oxydants, BERSIN propose dès 1933 l'hypothèse de la structure thiolique de la papaïne. Cet auteur, en désignant la molécule de papaïne active par Pa-SH, admet la réaction réversible

$$2\ Pa - S - H \rightleftarrows Pa - S - S - Pa$$

qui aboutit par oxydation à la forme inactive Pa — S — S — Pa, le groupement SH libre étant indispensable pour l'activité protéolytique du ferment. Le caractère *réversible* de l'inactivation par $H^2O^2$ est démontré en premier par BERSIN et LOGEMANN qui chiffrent l'activité d'une préparation de papaïne avant tout traitement par 0,53 ; l'action de $H^2O^2$ 0,002 m pendant 5 minutes à 40° la fait tomber à 0,02 et $SH^2$ la ramène à la valeur de 0,19. A part l'activation par les réducteurs et l'inhibition par les oxydants certains faits expérimentaux militent en faveur de l'hypothèse de BERSIN. MORGAN et FRIEDMANN (1938) signalent l'inactivation de la papaïne par l'acide maléique qui bloque d'une façon générale les groupements —SH libres. La fixation d'un métal lourd tel que Zn sur —SH supprime l'activité de la papaïne et rend la préparation insensible à l'action éventuelle des réducteurs (SCHOEBERL et FISCHER, 1939). Les complexes de Cu et Hg se comportent de même (HELLERMAN et PERKINS, 1934). La constitution de la papaïne permet effectivement d'envisager l'hypothèse de BERSIN : alors qu'une préparation purifiée de papaïne ne contient ni cystéine ni cystine libre, son hydrolyse libère de la cystine et un peu de méthionine. Des recherches récentes (GREENBERG et WINNICK, 1940) montrent que d'autres enzymes protéolytiques d'origine végétale, telles la broméline et l'asclépaïne, extraite de l'*Asclepias mexicana*, se comportent comme la

papaïne alors que la solanaïne provenant de *Solanum élaegnifolium* est insensible aux oxydants et réducteurs et peut par contre être inactivée par l'acide nitreux et le kétène ; l'activité de la solanaïne exigerait donc la présence d'un groupement phénolique libre au lieu du groupement —SH libre nécessaire pour l'activité des papaïnases.

Si l'on admet l'inactivation réversible par les oxydants d'après un mécanisme tel que celui proposé par Bersin, la nature des oxydants employés ne doit avoir qu'une importance secondaire. De notre point de vue cependant, à savoir la détermination des potentiels d'oxydation-réduction des milieux correspondant à l'activation et le bloquage de l'activité protéolytique, il y a intérêt à dresser une liste des oxydants utilisés.

Dans leur travail de 1933 Bersin et Logemann obtiennent l'inactivation par $H^2O^2$, la quinone, l'iode et les séléniates. A cette liste Hellerman et Perkins (1934) et Maschmann et Helmert (1934) ajoutent le ferricyanure et Joergensen (1935 et 1938) le bromate, l'iodate, le perborate de soude et le persulfate d'ammoniaque. Bergmann et Ross (1935) et Bergmann et Zervas (1936) montrent que l'inactivation par l'iode est réversible au moins pour la peptidase II alors que l'autre constituant de la papaïne, la peptidase I, peut se trouver détruite irréversiblement.

Déjà en 1931, Grassmann, Schoenebeck et Eibeler avaient envisagé la possibilité que le potentiel d'oxydation-réduction du milieu pouvait intervenir dans l'activation de la papaïne, mais aucune mesure n'a été faite. Un certain nombre d'expériences montre ensuite que la simple addition de substances activantes ou inhibitrices ne donne pas toujours le résultat escompté. Nous relevons à ce sujet les résultats complexes obtenus par Maschmann et Helmert (1935) avec le ferricyanure et la discussion entre Maschmann et Bersin (1935) sur ces expériences : il en résulte apparemment que le ferricyanure pouvant être réduit par le milieu dans certaines conditions n'intervient évidemment plus comme oxydant sur l'activité de la papaïne. Les expériences signalées par Ganapathy et Sastri (1939) comportant une inhibition de la papaïne par $H^2O^2$ vis-à-vis de certains substrats et non vis-à-vis d'autres exigeraient également pour leur interprétation un complément d'information portant sur la persistance de $H^2O^2$ au moment de l'action du ferment ou sur le niveau de potentiel réalisé dans le milieu.

Les expériences que nous avons publiées dès 1935 et 1936 montrent en effet une très grande simplification des conclusions dès qu'on introduit comme variable le potentiel d'oxydation-réduction du milieu. Les réducteurs agissent en amenant

le système enzymatique dans la zone d'activité, les oxydants le placent à un potentiel en dehors de cette zone quand nous envisageons l'activité lytique. En réalisant, au contraire, au moyen d'oxydants quelconques en quantité convenable un potentiel élevé compris entre des limites bien définies, on met en évidence une activité condensatrice du ferment.

Pour terminer cette revue bibliographique, nous signalerons qu'il doit y avoir d'autres mécanismes d'activation et d'inhibition que ceux qui interviennent sur la réaction Pa-SH ⇆ Pa — S — S — Pa. Il faut probablement interpréter ainsi l'inactivation par l'acide iodacétique (Maschmann, 1935) et celle par l'acide diméthylbarbiturique (Maeda, 1937) qui montre que la présence d'un groupement aldéhydique est également indispensable pour l'activité de la papaïne.

Un certain nombre d'auteurs (Mendel et Blood, Mauthner, Fruton et Bergmann) s'élèvent contre la théorie de Bersin en apportant des arguments tendant à montrer que les activateurs agissent à la façon de coferments et non pas en transformant une forme inactive de la papaïne en une forme active. Leurs expériences pourraient être interprétées plus facilement en envisageant les variations de potentiel du milieu dans les conditions réalisées ; cependant aucune mesure de potentiel n'a été effectuée.

## Expériences personnelles.

N'ayant pu ni fournir à la papaïne son substratum physiologique ni disposer de préparations fraîchement extraites, nous avons opéré de la façon suivante. La papaïne utilisée est une préparation Byla (titre 80) obtenue par dessiccation de sucs purs provenant de l'exsudation des fruits de *Carica papaya* de Ceylan. Dans la plupart de nos séries d'expériences, nous l'avons utilisée telle quelle, dans d'autres nous l'avons purifiée d'après Willstaetter et Grassmann : 3 grammes de la préparation brute sont délayés dans 200 $cm^3$ d'eau, additionnés de 0,75 gr. de cyanure de K et laissés trois jours à l'étuve ; ensuite on amène la préparation à une teneur de 80% d'alcool, on centrifuge, le culot est dissous dans de l'eau et filtré. Au lieu d'évaporer cette solution dans le vide, nous l'avons utilisée directement. Cette préparation produit, exactement comme la préparation brute, les phénomènes d'hydrolyse et de condensation que nous allons décrire.

Bien que nos essais aient montré qu'une activation spécifique n'est pas indispensable dans les conditions de nos expé-

riences ou plus exactement qu'elle est obtenue par un potentiel d'oxydation-réduction du milieu suffisamment bas, nous avons souvent ajouté à la papaïne au moment du délayage du cyanure de K ou du ferrocyanure de K (une goutte d'une solution concentrée pour 0,1 gr. de papaïne) que nous avons laissé agir pendant une demi-heure environ et qui active comme le cyanure. La concentration de papaïne dans le milieu de digestion a été le plus souvent de 1 p. mille.

Le substratum est de la gélatine Coignet (étiquette or) à 10%. En amenant tous les lots au même volume final, nous avons réalisé une concentration du milieu de 5 %. La stérilité est assurée par une addition de toluène.

Les témoins sont des lots placés à la glacière électrique réglée à 0° et qui sont dosés en même temps que les lots ayant séjourné à l'étuve. Cette façon de faire n'offre pas une garantie absolue. Des dosages de contrôle avant et après séjour à la glacière ont montré un très léger début de digestion (effectuée peut-être avant le refroidissement du milieu). Des témoins conservés à la glacière après addition d'une substance inhibitrice ou plongés immédiatement dans un mélange réfrigérant ont par contre donné toute satisfaction.

Les digestions sont effectuées pendant 3 heures à 37°. L'augmentation de l'azote formoltitrable est rapportée à celle obtenue sans addition d'oxydants ni de réducteurs après 6 heures de séjour à l'étuve, délai après lequel un équilibre est atteint dans les conditions de l'expérience. Nous tirons donc de nos dosages dans chaque série les valeurs de rendement. Pour établir ce rendement, il faut d'abord retrancher de la quantité d'azote formoltitrable trouvée dans le lot expérimenté celle préexistante avant la digestion, puis rapporter cette valeur à la quantité maxima d'azote formoltitrable dégagé au terme d'une digestion complète. Ce rapport sera exprimé en p. cent de la valeur maxima. Cette double opération peut être symbolisée par la formule suivante où N représente l'azote formoltitrable.

$$\text{Rendement} = \frac{\text{N lot expérimenté} - \text{N lot glacière}}{\text{N lot digéré totalement} - \text{N lot glacière}} \times 100$$

Les valeurs ainsi obtenues restent comparables d'une expérience à l'autre même si les conditions varient légèrement.

## Résultats.

Dans quelques expériences préliminaires, nous avons cher-

ché le pH optimum du milieu pour l'hydrolyse de la gélatine. On sait en effet que l'optimum varie suivant le substratum et les conditions ; il n'était par conséquent pas prudent d'emprunter un chiffre à la littérature. Voici le protocole d'une expérience :

Papaïne Byla 0,05 g + 0,5 cm³ de solution saturée de ferrocyanure de K ; addition de 40 cm³ de gélatine à 10% fondue, le volume est complété à 80 cm³. Un échantillon est porté à la glacière ; d'autres sont additionnés de quantités progressives de ClH 1N, et HO Na 1N et portés à l'étuve pendant trois heures. Un dernier lot y séjourne huit heures. Le pH est mesuré à l'antimoine. Les résultats numériques des dosages sont indiqués dans le tableau suivant :

| | pH mesuré à l'électrode à antimoine | | Formoltitration en cm³ HONa N/25 pour 3 cm³ avant — après addition de formol | | Rendement calculé % |
|---|---|---|---|---|---|
| | initial | final | | | |
| Témoin glacière. . | 6,30 | 6,17 | 2,0 | 5,1 | |
| Etuve, 3 h. . . . . | 6,30 | 6,08 | 1,3 | 7,6 | 71 |
| + ClH . . . . . | 5,62 | 5,33 | 2,3 | 7,6 | 71 |
| — . . . . . | 4,88 | 4,80 | 3,5 | 7,4 | 66 |
| — . . . . . | 4,03 | 4,16 | 5,4 | 6,8 | 49 |
| + HONa . . . . . | 7,02 | 6,75 | — | 7,2 | 60 |
| — . . . . . | 7,78 | 7,86 | — | 5,5 | 11 |
| Etuve, 8 h. . . . . | 6,30 | 5,99 | 1,5 | 8,6 | |

L'optimum, d'après cette expérience et de nombreuses autres, est situé aux environs de pH 6, mais l'activité est notable entre pH 4 et 7 environ. On relève des évolutions assez notables de pH au cours de la digestion. Pour les supprimer et pouvoir travailler à pH constant dans les séries à potentiel d'oxydation-réduction variable, nous avons ajouté, dans la plupart des expériences ultérieures, une quantité d'un tampon au citrate 0,5 M correspondant au dixième du volume du milieu.

Les variations de potentiel ont été obtenues par addition de différents oxydants et réducteurs. Les lots ont été placés dans les tubes décrits plus haut, au moins pour les milieux réducteurs. Le potentiel a été suivi facilement, grâce à ces dispositifs, au cours du séjour à l'étuve et en tout cas mesuré avant le dosage final. L'intensité de la digestion se montre variable suivant les conditions. Dans les cas d'inhibition plus ou moins complète, constatée par la formoltitration, la géla-

tine reprend en gel à la température ordinaire ; elle reste au contraire liquide dans tous les échantillons pour lesquels la formoltitration accuse une hydrolyse dosable. Voici le protocole d'une expérience mettant en évidence l'influence du potentiel d'oxydation-réduction du milieu :

Milieux contenant papaïne 0,05 gr., gélatine à 10% 50 cm³, tampon de citrate de Na à pH 6,8 10 cm³, volume complété à 100 cm³.

| | Potentiel final en mV | Formoltitr. en cm³ NaOH N/25 avant et après addition de formol | | Rendement calculé % | Etat final du milieu refroidi |
|---|---|---|---|---|---|
| Témoin glacière. ..... | | 2,3 | 1,4 | | |
| Etuve 6 h. ..... | | 3,4 | 3,7 | | liquide |
| Etuve 3 h. ..... | +218 | 3,3 | 3,4 | 87 | — |
| Etuve 3 h. + $H^2O^2$ .. | +252 | 3,3 | 3,5 | 91 | — |
| — .. | +262 | 3,2 | 3,0 | 70 | — |
| — .. | +340 | 2,5 | 1,5 | 4 | solide |
| — .. | +375 | 2,4 | 1,5 | 4 | — |
| + hydrosulfite... | +228 | 3,4 | 3,4 | 87 | liquide |
| — .. | — 10 | 3,3 | 3,5 | 91 | — |
| — .. | — 20 | 3,2 | 3,4 | 87 | — |

L'activité de la papaïne devient donc négligeable vers + 300 mV et est aproximativement constante à tous les potentiels en-dessous de cette valeur.

L'activité de la papaïne étant suffisante pour les dosages dans une zone de pH assez étendue, nous avons fait 4 séries d'expériences à des pH différents, à savoir 4,8 ; 5,5 ; 6,3 et 6,8. Dans chacune d'elles, nous avons calculé les rendements et les graphiques de la fig. 6 résument les résultats. Ils montrent pour chaque pH qu'au-dessus d'un certain potentiel, l'action de la papaïne est nettement arrêtée. Au-dessous de ce potentiel et jusque dans les milieux très réducteurs, l'activité paraît constante. Les potentiels d'arrêt sont +400 mV à pH 4,8, +365 mV à pH 5,5, +310 mV à pH 6,3 et +268 mV à pH 6,8 ; ils correspondent à rH 23,4 ; 23,6 ; 23,3 et 22,8. Il est intéressant de noter que les potentiels des mélanges réalisés sans addition d'oxydants ni de réducteurs se trouvent près de la limite supérieure de la zone d'activité.

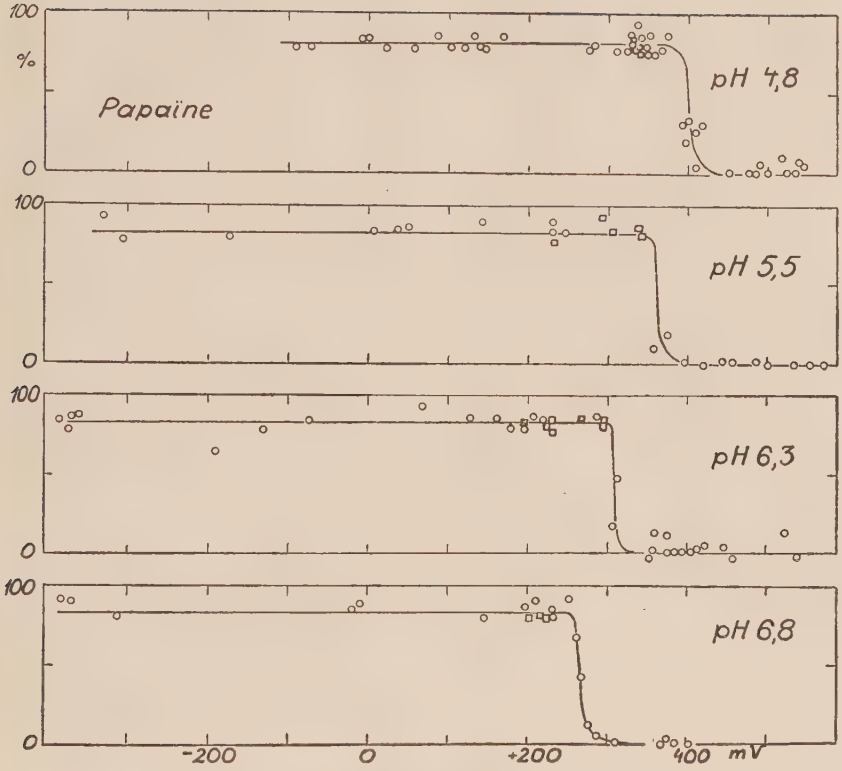


Fig. 6. — Action de la papaïne sur la gélatine. Courbes d'activité hydrolytique de la papaïne en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu pour différents pH.

En abscisses, les potentiels d'oxydation-réduction en mV, en ordonnées l'intensité de l'hydrolyse en p. cent de l'hydrolyse totale possible.

---

## La graine d'orge.

La graine d'Orge nous a semblé devoir fournir un matériel favorable pour l'étude d'un système protéolytique. En une dizaine de jours de germination, 35% de l'azote total sont solubilisés, transportés et resynthétisés dans la jeune plantule (Effront). Le ferment nécessaire pour cette mobilisation de l'azote a de bonne heure tenté les chercheurs. Il est signalé dès 1900 par Fernbach et Hubert et par Weis. Harlay

le compare à la trypsine. Butkewitsch fait le premier extrait de graines contenant le ferment protéolytique dont il étudie l'action (1900). D'après Grimmer, l'activité protéolytique de l'Orge place celle-ci au premier rang parmi les graines. Plus tard, l'enzyme est étudié de plus près : Lundin la fait agir sur la gélatine et la peptone de Witte. Mounfield montre que le malt contient une dipeptidase (pH optimum 7,3 à 7,9) et une protéase (pH optimum de l'action sur l'édestine : 4,1 ; sur la gélatine : 5,1 et sur le glutène : 6,0).

Les indications de la littérature sur l'activation du ferment protéolytique de la graine d'Orge sont contradictoires. Pour Mounfield, le cyanure est sans action. Pour Prokoshew, les résultats sont variables suivant qu'on considère l'activité protéasique (substratum : gélatine) ou l'activité peptidasique (substratum : peptone) et aussi suivant l'espèce végétale de graine étudiée. Joergensen (1936) admet une activation des protéinases des farines par le glutathion, l'eau de levure et l'acide ascorbique. Ford et Maiden cependant s'inscrivent en faux contre cette interprétation des expériences de Joergensen. Nous n'analyserons pas plus avant ces résultats étant donné que ce qui importe à notre avis (et nous en fournirons ci-dessous la démonstration) n'est pas la présence ou l'absence d'une substance spécifique, mais le fait d'amener le milieu dans une zone de potentiel favorable.

Des chiffres donnés par Hesse montrent que la formoltitration est l'épreuve la plus sensible pour mettre en évidence l'évolution de l'azote dans un extrait de malt (tableau 2) :

TABLEAU II (Hesse)

| Azote en mg. pour 100 g. de substance sèche | Action protéolytique de malt à 50° | | |
|---|---|---|---|
| | 1/2 | 1 | 4 heures |
| N non précipitable ..... | 146 | 195 | 319 |
| N formoltitrable ..... | 38 | 63 | 123 |
| N précipitable par $MgSO_4$... | 22 | 27 | 33 |
| N précipitable par le tanin . | 22 | 27 | 53 |

Nous avons examiné le système protéinasique de la graine d'Orge en le faisant agir sur les protéines propres de la graine passant dans un extrait aqueux.

Des essais préliminaires ont montré que l'activité protéinasique de la graine est sensiblement la même, que la graine soit broyée à l'état sec ou au cours de la germination, à condition de se placer au même pH et au même potentiel d'oxydation-réduction. Il nous a donc paru plus simple de prendre comme point de départ la graine sèche. La technique générale de nos essais est la suivante : les graines d'Orge sont broyées grossièrement dans un broyeur mécanique, puis réduites en poudre au mortier. Environ 20 gr. de cette poudre sont additionnés de 100 cm³ d'une solution de ClNa à 9 p. 1000. On laisse gonfler à température ambiante pendant une demi-heure en agitant ; on broie encore et on centrifuge. Le li-

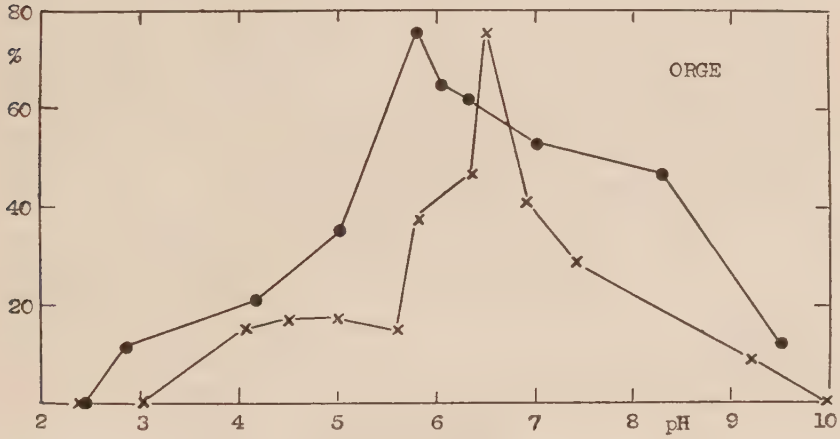


Fig. 7. — Autolyse d'un extrait aqueux d'Orge en fonction du pH (deux expériences).
En abscisses, le pH des extraits, en ordonnées l'intensité de l'autolyse exprimée par l'augmentation de l'azote formoltitrable en p. cent de la quantité initiale.

quide légèrement trouble est additionné de deux gouttes de tri-crésol. Nous avons choisi cet antiseptique plus énergique que le toluène généralement employé dans nos expériences, car les graines d'Orge récoltées sans précaution spéciale sont généralement très souillées (Effront a dénombré $2.10^5$ à $10^7$ germes par gr. de graines). Amené au pH et au potentiel voulus, l'extrait est distribué dans les tubes décrits antérieurement. On porte à l'étuve à 37° pendant 48 heures et l'on compare l'azote formoltitrable final à celui qui existait dans le milieu au départ de l'expérience. Dans des conditions favorables, les groupements aminés libres augmentent du simple au double par protéolyse. L'extrait d'Orge ainsi obtenu étant très peu tamponné, nous avons essayé d'in-

troduire des électrolytes, mais il nous a semblé que l'activité protéinasique se trouvait fortement réduite en présence de phosphate, d'acétate ou de citrate. Ce fait avait d'ailleurs déjà été signalé par MOUNFIELD (1936).

En raison de l'absence de tamponnement de nos milieux, d'une part, et des réactions fermentaires se passant à côté de la protéolyse dans ces extraits complexes, d'autre part, le pH du milieu évolue considérablement au cours du séjour à l'étuve, et ceci d'une façon variable suivant les conditions physico-chimiques imposées au milieu. Les indications de pH tirées d'une mesure à l'électrode d'antimoine au départ de l'expérience, ne sont donc que très approximatives. Certaines séries d'expériences ont été faites en présence de glycérine. Cette addition diminue l'évolution du pH sans modifier la protéolyse.

Nous avons fait quelques essais pour déterminer l'optimum de pH pour la protéolyse qui s'effectue dans l'extrait total tel que nous l'avons réalisé. Celle-ci se montre notable entre pH 4 et 9, elle présente un optimum aux environs de pH 6. La figure 7 traduit 2 expériences typiques.

Nous avons fait ensuite trois séries d'expériences en opérant aux pH initiaux de 6, 7 ou 8 et en amenant des lots d'un même extrait à des potentiels différents. Le potentiel dans les tubes s'installe spontanément à des niveaux variables suivant qu'on bouche le tube hermétiquement en absence de bulles d'air, qu'on laisse le milieu en contact avec une bulle d'air ou qu'on l'agite à l'air au début de l'expérience.

## TABLEAU III

Evolution du potentiel d'oxydation-réduction d'extraits aqueux de graines d'Orge à la suite d'additions de différents réactifs.

| Réactif ajouté : | 4 heures | 20 heures | 50 heures |
|---|---|---|---|
| $H^2O^2$, 3 gouttes /10 $cm^3$... | + 470 | + 430 | + 450 mV |
| Acide ascorbique (tube fermé sans air)..... | + 85 | + 27 | + 40 |
| Acide ascorbique 0,01g / 10 $cm^3$..... | + 29 | + 8 | — 4 |
| Bleu de méthylène..... | + 30 | — 32 | — 21 |
| Bleu de méthylène partiellement réduit..... | — 5 | — 58 | — 62 |
| Bleu de méthylène réduit.. | — 365 | — 90 | — 103 |

D'autres potentiels sont obtenus par addition en quantités variables de réactifs tels que ferricyanure de K, perhydrol neutralisé, persulfate, acide ascorbique, méloquinone, bleu de méthylène réduit à l'hydrosulfite ou hydrosulfite en solution faiblement alcaline. A la suite de l'addition de ces différents réactifs, le

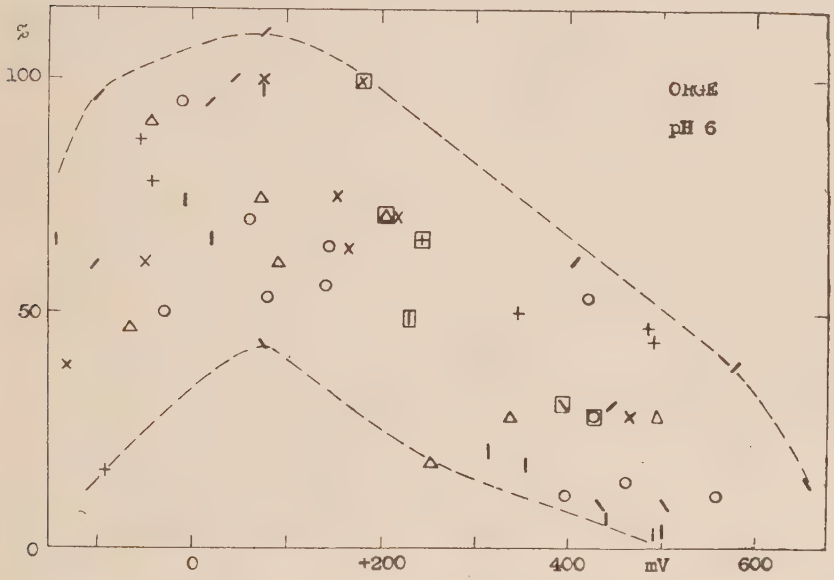


Fig. 8. — Autolyse d'extraits aqueux d'Orge à pH 6 en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu.

En abscisses, le potentiel d'oxydation-réduction du milieu en mV, en ordonnées l'intensité de l'autolyse exprimée par l'augmentation de l'azote formoltitrable en p. cent de la quantité initiale (1).

(1) Nous donnerons à la suite une série de figures du même type exprimant l'intensité du rendement de l'autolyse en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu. On trouvera toujours en abscisses ce potentiel exprimé en mV, en ordonnées l'augmentation de l'azote formoltitrable exprimée en p. cent de la quantité initiale. Chaque point correspond à une expérience. Les différents signes utilisés dans le graphique correspondent à des séries d'expériences différentes. Pour chaque série, le lot qui ne comporte aucune addition ni d'oxydant ni de réducteur est entouré d'un carré. Nous traçons en pointillés l'enveloppe des points expérimentaux. L'ensemble de ces graphiques contient la totalité de nos expériences exécutées dans les conditions indiquées. Certains des graphiques permettent de définir une courbe moyenne caractéristique de l'action du potentiel sur l'activité autolytique. D'autres graphiques sont moins démonstratifs en raison de la dispersion des points expérimentaux ; nous les publions cependant pour donner la totalité de nos expériences et parce que, sans permettre une conclusion individuellement, ils viennent néanmoins à l'appui des conclusions générales d'autres séries plus précises.

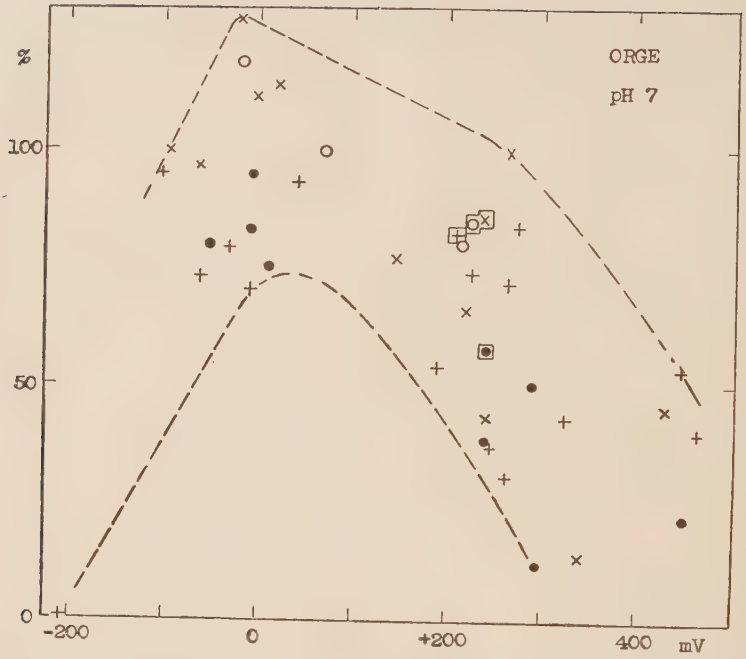


FIG. 9. — Expérience analogue à celle de la fig. 8 : pH du milieu = 7

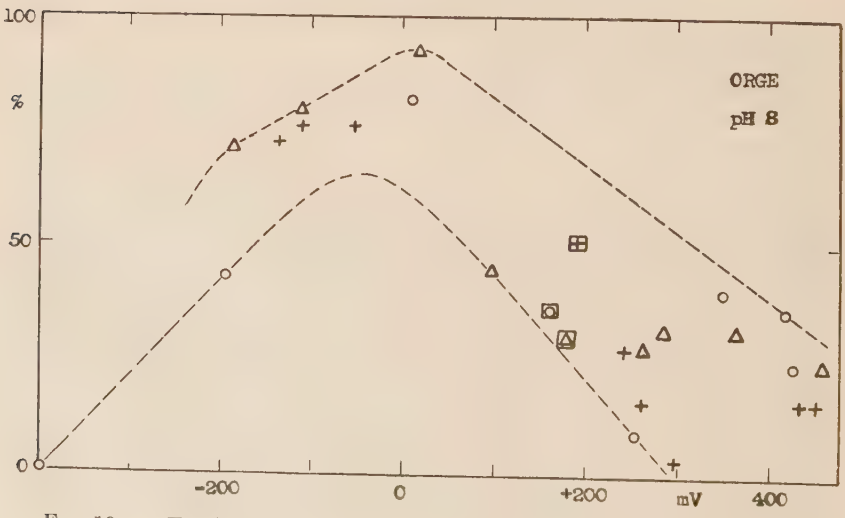


FIG. 10. — Expérience analogue à celle de la fig. 8 : pH du milieu = 8.

potentiel peut rester stable si la substance introduite comporte un pouvoir tampon dans la zone du potentiel réalisé ; dans le cas contraire, on assiste à des évolutions dont nous donnons quelques exemples (tableau 3). On voit qu'après des variations initiales souvent considérables, le potentiel se maintient ensuite, pendant la plus grande partie du temps de digestion, dans une zone suffisamment bien définie pour que la mesure finale de potentiel que nous utilisons ait une signification.

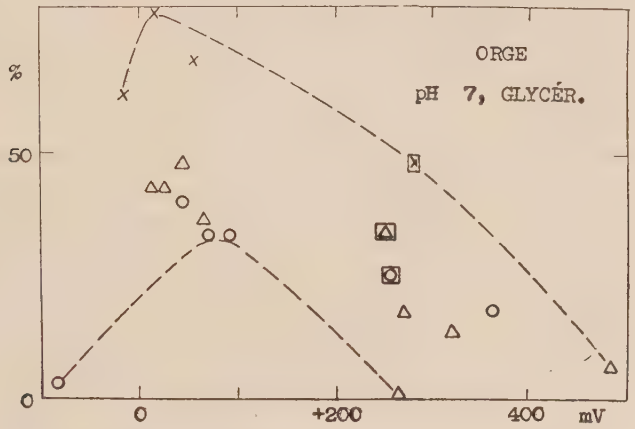


Fig. 11. — Expérience analogue à celle de la fig. 8 : pH du milieu = 7, addition de glycérine.

Nous avons constaté dans ces conditions (voir fig. 8, 9 et 10) qu'une augmentation de potentiel (par rapport à celui s'installant dans les lots qui ne sont additionnés d'aucun réactif) diminue encore le rendement de la protéolyse. Un abaissement du potentiel au contraire intensifie la libération de groupements aminés pour l'amener à un maximum qui est atteint dans les trois séries d'expériences aux environs de 0 mV par rapport à l'électrode à hydrogène normale. Quand on abaisse le potentiel au-delà, l'activité protéinasique diminue ; il y a donc comme pour le pH un optimum d'activité dans l'échelle des potentiels d'oxydation-réduction. Une addition de glycérine au milieu ne change pas sensiblement les résultats (fig. 11).

---

### Paroi d'*Actinia equina* L.

Comme échantillon de tissu d'animaux inférieurs, nous avons choisi la paroi d'*Actinia equina L.* Cette Actinie se trouve

en grandes quantités à Roscoff (Bretagne) sur les rochers entre les niveaux des hautes et basses mers moyennes. Nous avons pu utiliser pour chaque expérience au laboratoire de Roscoff des animaux qui venaient d'être prélevés sur la grève ou qui, du moins, n'avaient séjourné que très peu de temps dans un aquarium bien aéré.

Les Actinies peuvent, suivant les conditions d'alimentation, présenter soit des croissances très rapides, soit des fontes tissulaires considérables. Nous pouvions donc supposer l'existence d'un système fermentaire apte aux hydrolyses comme aux synthèses des protéines. Chez *Anemonia sulcata*, Saviano a signalé l'existence d'une tryptase active en milieu neutre et faiblement alcalin. L'inconvénient du matériel choisi est son hétérogénéité du point de vue histologique. En lavant les Actinies à l'eau de mer et en raclant la face intérieure de l'animal fendu par un coup de ciseaux, nous avons pensé obtenir un point de départ aussi constant que possible.

Quelques essais préliminaires ont mis en évidence une activité protéolytique notable d'une purée de paroi ; cette activité se manifeste dans une large zone de pH aux environs de la neutralité. La présence d'un tampon de pH est nécessaire, la purée étant extraordinairement peu tamponnée : la purée initiale sans aucune addition étant à pH 6,9 à 7,3, l'addition d'une goutte de ClH n/10 à 60 $cm^3$ de purée diluée 5 fois abaisse le pH à 5 ; 3 gouttes l'amènent à pH 2,5. D'autre part, la présence de phosphate s'est montrée indifférente quant aux activités enzymatiques que nous avons recherchées. Le pH descend considérablement au cours de l'autolyse (de 7 à 5, par exemple), si l'on n'introduit pas de tampon. Pour éviter cette variation qui rendrait illusoire toute interprétation des potentiels de platine mesurés, nous avons systématiquement opéré en milieu phosphaté n/20. L'autolyse apparaît comme assez peu sensible au pH : une zone d'activité maxima s'étend de pH 5,8 à 8,3. Nous avons donc pu explorer l'influence du potentiel d'oxydation-réduction du milieu pour plusieurs pH assez éloignés les uns des autres.

Nous donnons un protocole d'expérience pour indiquer la technique suivie et montrer en même temps le caractère relativement homogène des résultats obtenus dans une même série d'expériences. D'une série à l'autre, l'amplitude des phénomènes observés a été, au contraire, assez variable.

Expérience 9 : Sept individus d'*Actinia equina* en bon état sont ouverts. Il se produit une contraction énergique de la paroi dont on lave et racle la face interne. 15 g. de paroi ainsi obtenus sont broyés au mortier à l'aide de sable lavé et additionnés de 30 $cm^3$ d'eau

distillée, 20 cm³ d'eau de mer et 10 cm³ de tampon de phosphates n/2 à pH 6.7. La suspension est centrifugée ; le liquide trouble est réparti en lots différemment traités et porté à l'étuve à 38° pendant 22 heures après addition d'une goutte de toluol dans chaque tube. A la sortie de l'étuve, on mesure les potentiels d'oxydation-réduction des échantillons et on titre à la soude n/25 d'après SOERENSEN.

| | Potentiel final en mV | Formoltitration en cm³ NaOH N/25 avant — après addition de formol | | Augmentation de N formoltitrable en % du témoin |
|---|---|---|---|---|
| Témoin glacière. ..... | | 2,02 | 0,67 | |
| Etuve, sans addition. ..... | +306 | 1,90 | 1,02 | 53 |
| Etuve, agité énergiquement au début du séjour à l'étuve. . | +326 | 1,72 | 0,92 | 38 |
| Etuve, tube fermé sans air . . | — 40 | 1,45 | 0,95 | 42 |
| Etuve, + ascorbate Na, avec air ..... | +194 | 1,90 | 1,05 | 57 |
| Etuve, + ascorbate Na, sans air ..... | — 6 | 1,07 (?) | 0,99 | 48 |
| Idem, quantité d'ascorbate plus forte ..... | — 88 | 1,75 | 0,95 | 42 |
| Etuve, + bleu de méthylène sans air. ..... | + 38 | 1,55 | 0,98 | 47 |
| Etuve, + bleu de méthylène réduit sans air. . . . . | —331 | 1,85 | 0,70 | 5 |
| Idem. . . . . | —346 | 1,90 | 0,68 | 2 |
| Etuve + hydrosulfite Na sans air ..... | —245 | 1,80 | 0,85 | 27 |
| Etuve + ferricyanure de K avec air. ..... | +418 | 1,90 | 0,85 | 27 |

Les résultats de cette expérience se transcrivent en une courbe à optimum de potentiel très net avec inhibition de l'activité aux potentiels bas et élevés. Le lot laissé sans addition et en présence d'air ne réalise pas les conditions optimales. La purée utilisée paraît peu tamponnée vis-à-vis des variations du potentiel d'oxydation-réduction comme pour les variations du pH. Le seul conditionnement des lots en dehors de toute addition de réactifs (à savoir le diamètre des tubes, la quantité d'air en présence ou l'agitation) entraîne des variations notables du potentiel. D'autres variations sont obte-

nues par addition d'ascorbate, d'hydrosulfite de Na, de colorants plus ou moins réduits, de ferricyanure ou de $H^2O^2$. Les flottements de l'ensemble des valeurs expérimentales (voir fig. 12) en opposition avec la bonne précision obtenue dans une série (voir le protocole) ne semblent pas s'expliquer par la nature du réactif ou le procédé physique qui a permis d'obtenir le potentiel mesuré.

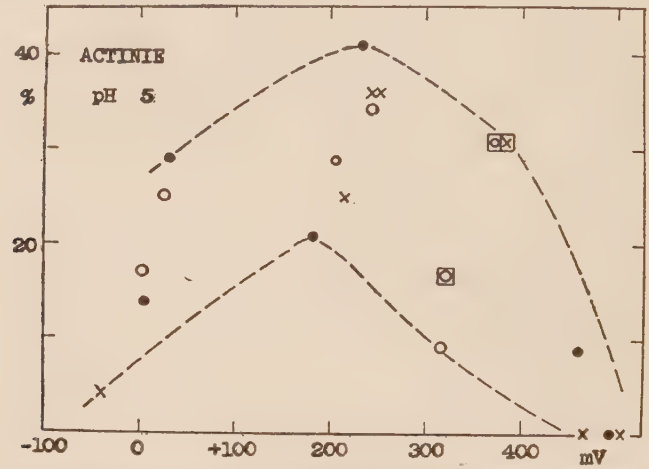


FIG. 12. — Activité autolytique d'un extrait aqueux de paroi d'Actinies *(Actinia equina L.)* en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu, pH = 5. (Voir note p. 47).

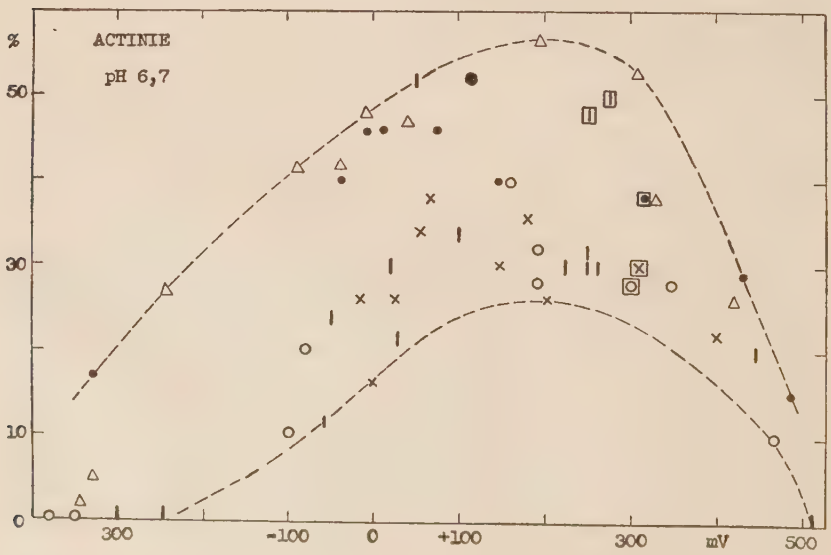


FIG. 13. — Expérience analogue à celle de la fig. 12, pH du milieu = 6,7.

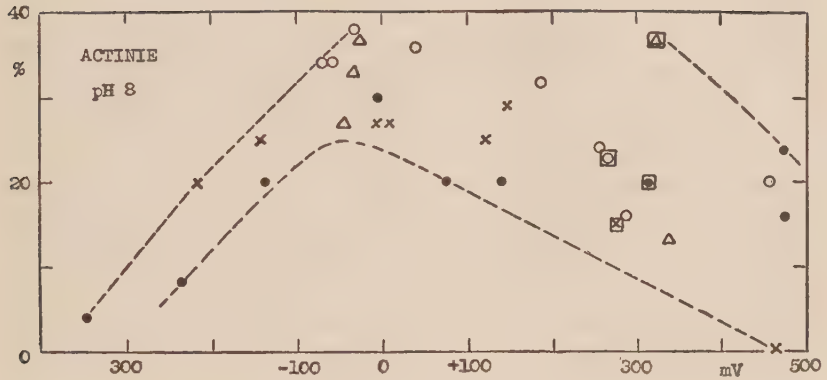


Fig. 14. — Expérience analogue à celle de la fig. 12, pH du milieu = 8.

Nous avons fait trois séries d'expériences à pH 5, 6,7 et 8. Les résultats sont rapportés dans les graphiques 12, 13 et 14. Malgré les variations d'amplitude qui sont frappantes, on note toujours l'existence d'un optimum de potentiel. Ce potentiel est plus bas que dans les lots réalisés sans intervention spéciale. Dans ces lots, l'hydrolyse est notable, mais se trouve augmentée, dans toutes nos séries, par un abaissement de potentiel, que celui-ci soit obtenu par introduction de réactifs chimiques ou par une mise en expérience anaérobie. Aux environs de +500 mV, l'activité lytique est complètement arrêtée, l'optimum se trouve à +200 mV pour pH 5, à +200 mV pour pH 6,7 et au-dessus de 0 mV pour pH 8. Les niveaux de potentiel s'installant spontanément se trouvent à +350 mV pour pH 5, à +310 mV pour pH 6,7, à +295 mV pour pH 8. Quand les milieux sont suffisamment réducteurs pour atteindre —350 mV, l'activité est nulle.

---

### Paroi musculaire d'*Arenicola marina* L.

Pour des raisons analogues à celles qui nous avaient fait choisir l'Actinie, nous avons abordé l'étude de l'autolyse tissulaire chez un Ver polychète *Arenicola marina L.* = *Arenicola piscatorum* Audouin. Bohn a décrit l'histolyse saisonnière qui, en automne, réduit les branchies et les téguments de l'Arénicole ; le rôle respectif de l'autolyse tissulaire et de la

phagocytose n'a pas été démêlé. Nous avons supposé que le déclenchement physiologique de l'autolyse dans certaines conditions n'est pas dû à l'apparition de ferments appropriés, mais à une modification des conditions physico-chimiques qui règlent l'activité des ferments existants. Nous n'avons pas trouvé l'indication qu'on ait mis en évidence des ferments protéolytiques chez l'Arénicole ; Ogata, Morimoto et Mori en ont étudié chez le Ver de terre : l'autolyse protéique présente un optimum entre pH 8,0 et 8,2. Quoi qu'il en soit l'Arénicole s'est révélé favorable à l'étude de l'autolyse. Soit spontanément après la mort, soit *in vitro* en présence d'antiseptiques, la lyse des tissus peut atteindre une grande intensité et être facilement mise en évidence par le dosage des groupements aminés libérés.

Les tissus ont été préparés de la façon suivante : après avoir sectionné la tête et la queue d'Arénicoles fraîchement ramassés sur la grève nous avons fendu le corps longitudinalement, enlevé l'intestin et raclé la face interne de la paroi musculaire. Cette paroi a été ensuite lavée à l'eau de mer, découpée aux ciseaux, broyée au sable et additionnée de 3 à 5 fois son volume d'eau de mer ; après décantation on obtient une suspension trouble qui est répartie en tubes à essai, additionnée d'une goutte de chloroforme et, éventuellement, de réactifs destinés à modifier les conditions physico-chimiques du milieu. Sur un témoin on dose immédiatement à la formoltitration les groupements aminés libres, les autres sont abandonnés 24 heures à la température du laboratoire (environ 20°) pour être titrés ensuite. L'autolyse est loin d'être complète après ce délai. Voici un exemple : dans un lot la formoltitration exige au départ 2,3 $cm^3$ de NaOH n/25 par $cm^3$ de milieu, 4,9 $cm^3$ après 24 heures, 5,15 $cm^3$ après 48 heures et 5,5 $cm^3$ après 96 heures. Nos expériences ont été cependant arrêtées après 24 heures pour des raisons de commodité et pour diminuer l'intervention éventuelle des réactions secondaires.

Nous avons d'abord examiné l'influence de l'acidité du milieu sur la protéolyse du système ainsi préparé. Les points expérimentaux obtenus mettent en évidence un optimum d'action aux environs de pH 7,3. L'activité protéolytique diminue très rapidement vers les pH bas et elle est très faible aux pH réalisés normalement dans les tissus de l'animal vivant (approximativement pH 6). A pH 5, les suspensions floculent et leur activité lytique est pratiquement nulle.

Dans une seconde série d'expériences nous nous sommes placé dans les conditions de pH optimales pour étudier l'influence des variations du potentiel d'oxydation-réduction du

milieu. Celui-ci semble très peu tamponné du point de vue des potentiels d'oxydation-réduction. Au moins interprétons-nous dans ce sens, d'une part, les écarts considérables des potentiels qui s'installent spontanément dans les lots témoins et, d'autre part, la difficulté de réaliser des potentiels déterminés. Les suspensions réalisées comme précédemment ont été amenées à pH 7,3 et additionnées soit de perhydrol neutralisé ou de ferricyanure de K, soit d'hydrosulfite en solution alcaline, ou encore de divers colorants qui, plus ou moins réduits à l'hydrosulfite, servaient de tampons d'oxydation-réduction. Les milieux sont placés dans des tubes fermés comportant dans le bouchon une électrode de platine. Au bout de 24 heures

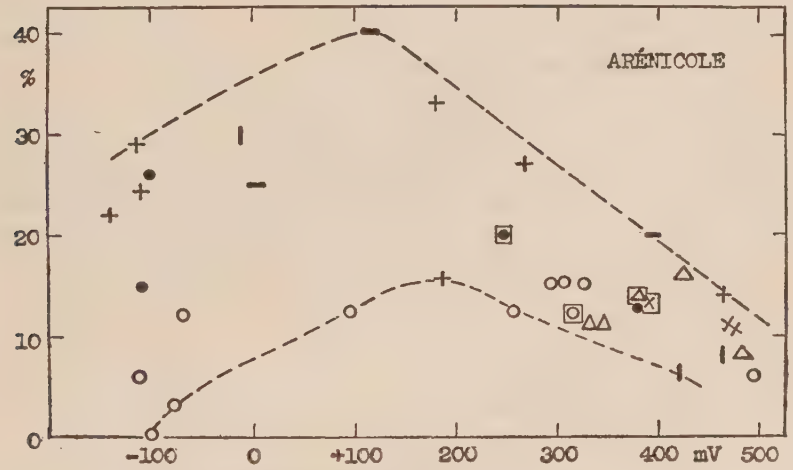


Fig. 15. — Activité autolytique d'un extrait aqueux de paroi musculaire d'Arénicole *(Arenicola marina L.)*, en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu. (Voir note p. 47).

on détermine l'augmentation des groupements aminés libres et formoltitrables par rapport au milieu initial. Le rendement de la digestion dépend du potentiel d'oxydation-réduction du milieu. La courbe traduisant les résultats expérimentaux (fig. 15) montre que la digestion à pH 7,3 se fait le mieux dans une zone de potentiel comprise entre 0 et +150 mV par rapport à l'électrode à hydrogène normale, c'est-à-dire dans un milieu faiblement réducteur. La digestion est moins intense aussi bien dans les milieux plus réducteurs que dans les milieux indifférents ou oxydants. Les lots préparés sans addition d'oxydants ni de réducteurs se placent entre +245 et +385 mV et se trouvent sur une pente de la courbe.

Nous avons vérifié que l'arrêt de la protéolyse dans les milieux réducteurs est réversible. Ainsi un lot qui au départ exige 1,70 cm³ de la NaOH n/25 pour doser l'azote formoltitrable et qui, amené par une trace d'hydrosulfite à —76 mV, arrive au bout de 24 heures à 1,75 cm³ est ensuite réoxydé à l'air. On partage en deux lots et on maintient encore 24 heures dans les mêmes conditions. Un lot se trouve à +299 mV et exige 1,95 cm³ de soude, pour l'autre les valeurs trouvées sont +305 mV et 1,93 cm³. L'autolyse qui avait été inhibée dans le premier milieu trop réducteur reprend donc après réoxydation.

---

**Substance musculaire de la Tanche.**

Contrairement aux matériaux précédents, la musculature de la Tanche (*Tinca vulgaris* Cuv.) se présente histologiquement comme assez homogène. La technique est simple : sur des tanches fraîchement tuées, on prélève de la substance musculaire

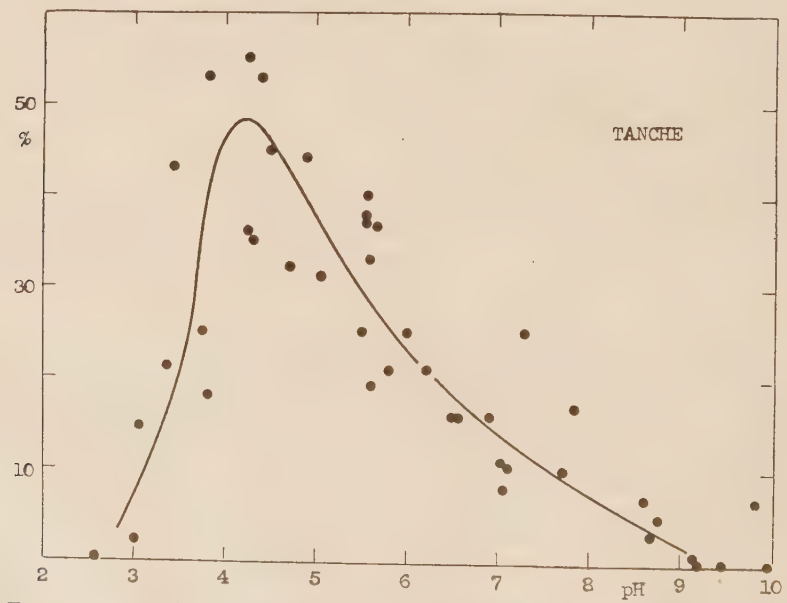


Fig. 16. — Activité autolytique d'un extrait aqueux de muscle de Tanche (*Tinca vulgaris* Cuv.), en fonction du pH du milieu. En abscisses le pH, en ordonnées l'augmentation de l'azote formoltitrable en p. cent de la valeur initiale. Les points correspondent à plusieurs expériences.

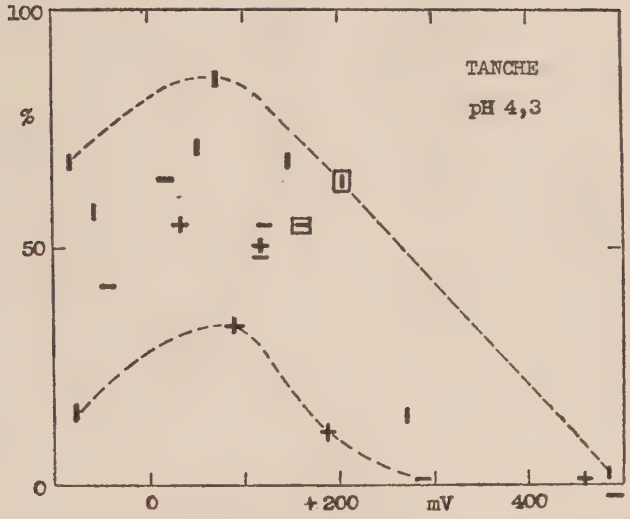


FIG. 17. — Activité autolytique d'un extrait aqueux de muscle de Tanche, en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu, pH = 4,3. (Voir note p. 47).

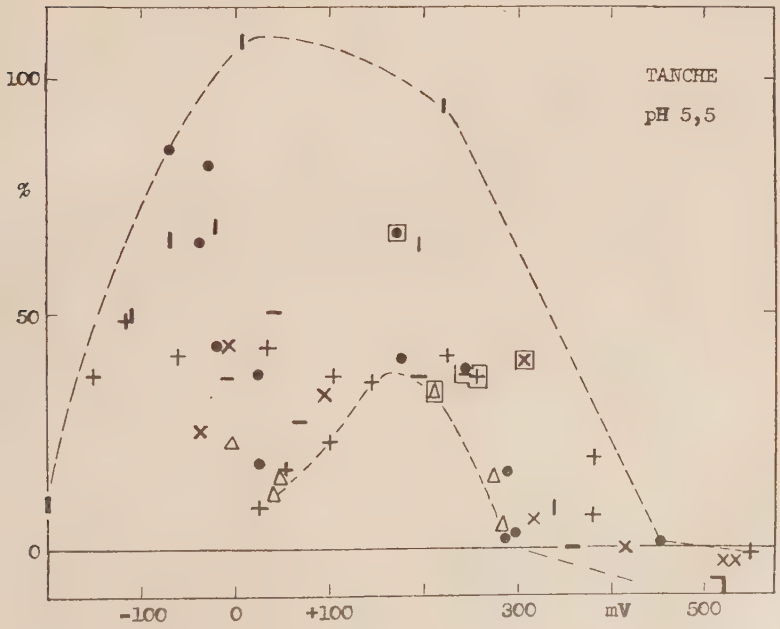


FIG. 18. — Expérience analogue à celle de la fig. 17, pH = 5,5.

qu'on réduit facilement en purée. 10 gr. de muscle sont amenés à une suspension très fine dans du sérum physiologique et éventuellement additionnés de tampon phosphaté. L'autolyse se fait pendant 65 heures à 37°. En absence de phosphates, la protéolyse des lots amenés à des pH différents peut être représentée par une courbe à maximum (fig. 16). La lyse est nulle au-dessous de pH 3 et au-dessus de pH 9. Elle atteint son optimum aux environs de pH 4,3. L'influence du potentiel d'oxydation-réduction a été explorée dans deux séries d'expériences exécutées à pH 4,3 et 5,5. Dans la série dont les lots ont été amenés à pH 4,3 toute protéolyse se trouve arrêtée quand on dépasse +400 mV, elle semble également diminuer quand le potentiel tombe aux environs de 0 mV. L'optimum se trouve autour de +150 mV (fig. 17). A pH 5,5, on note également un accroissement de l'activité quand le potentiel diminue de +350 mV, valeur qui représente la limite supérieure de l'autolyse, jusqu'aux environs de +50 mV, le potentiel le plus favorable (fig. 18).

Dans les lots amenés par introduction d'oxydants, $H^2O^2$ surtout, à des potentiels élevés (+500 mV p. e.), on note une diminution de l'azote formoltitrable sur laquelle nous reviendrons.

---

**Pulpe de la rate de veau.**

La rate subit dans des conditions favorables une protéolyse intense. Rosenbohm étudie comparativement la lyse protidique de divers tissus de Rat au bout de 24 heures et il trouve qu'elle atteint 90% des protéines dans le rein, 80% dans la rate, 70% dans le foie et le sarcome de Jensen greffé sur le Rat, 30% dans le cerveau et 0% dans le sérum. Le foie et la rate semblent donc indiqués pour nos expériences et la rate d'autant plus que dans cet organe, même adulte, des constructions protidiques se font normalement et que nous pouvions de ce fait espérer tirer profit du même matériel pour l'étude de la synthèse protidique aussi bien que pour celle de la lyse.

Le système protéolytique du foie et de la rate avaient été étudiés par Kleinmann et Werb (1931), d'une part, par Anson (1937), d'autre part, qui avaient conclu qu'il ne nécessitait pas la présence d'un activateur. Cependant, pour Fruton et

Bergmann l'enzyme protéolytique de la rate de Bœuf est susceptible d'être activé. Ainsi la présence de 0,004 millimol de cystéine par $cm^3$ de milieu intensifie l'action de l'enzyme sur tous les substrats étudiés, l'acide ascorbique n'agit que pour des substrats ayant un groupement α—aminé libre. Dans une nouvelle étude (1940) de la catepsine extraite de la rate, Anson examine l'action de la cystéine qui augmente de 54% l'activité du ferment. Cette activation est plus faible que celle signalée précédemment par Maver dans un extrait de foie. Anson explique cette différence par une purification insuffisante de l'extrait de Maver qui contiendrait, outre la catepsine, des poly- et des dipeptidases qui seraient plus sensibles à l'action de la cystéine que la catepsine. Cette discussion est sans importance pour nos expériences, car intentionnellement nous gardons l'ensemble du système protéolytique du tissu et nous étudions son activité globale.

La technique employée dans nos expériences est la suivante : la rate de veau est pulpée en raclant des tranches avec un couteau, la pulpe est broyée au mortier avec du sable, mise en suspension dans quatre fois son volume de sérum physiologique, additionnée de chloroforme et ensuite centrifugée. Le liquide trouble ainsi obtenu a un pH de 6,35 (valeurs extrêmes notées : 6,2 et 6,5). L'enzyme protéolytique qu'il contient est très résistant et son action est lente et prolongée. Ainsi après huit jours d'autolyse à l'étuve dans des conditions optimales de pH on peut faire une expérience établissant l'influence du potentiel d'oxydation-réduction sur le liquide autolysé et on constate que la protéolyse continue encore dans les lots comportant des conditions physico-chimiques favorables et que le potentiel exerce la même influence qu'avec de la pulpe fraîche. Même après quinze jours d'étuve, l'enzyme protéolytique est encore actif, alors que la catalase par exemple disparaît en quelques heures d'étuve. La catalase disparaît d'ailleurs également par un séjour à la glacière qui laisse intact le système protéolytique. Nous avons profité de cette circonstance pour nous débarrasser de la catalase et pour pouvoir ainsi introduire comme oxydant dans certains lots expérimentaux de l'eau oxygénée (perhydrol neutralisé) sans assister à sa décomposition immédiate.

Nous avons d'abord établi l'optimum de pH de l'hydrolyse des protéines de l'extrait de rate par l'ensemble des ferments qu'il contient. Dans ce but, des échantillons sont amenés à des pH allant de 3 à 9,5 par addition de ClH ou de HONa sous le contrôle de l'électrode à antimoine. Ces échantillons sont abandonnés à 37° pendant 24 heures et l'azote aminé est dosé par formoltitration et comparé avec celui du liquide

initial. L'influence du pH peut être analysée avec une bonne précision, car ses variations en cours d'autolyse sont relativement faibles. Les résultats de trois expériences sont reproduits dans le graphique 19 ; il en résulte qu'il y a deux optima

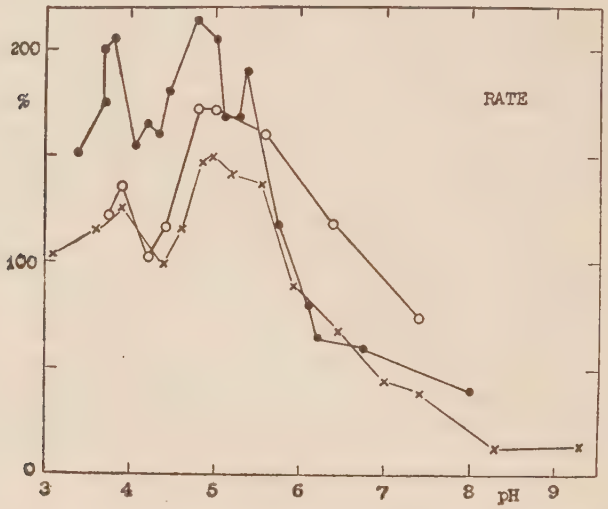


Fig. 19. — Activité autolytique d'un extrait aqueux de pulpe de rate en fonction du pH du milieu. Trois expériences différentes. En abscisses le pH, en ordonnées l'augmentation de l'azote formoltitrable en p. cent de la valeur initiale.

situés à pH 3,8 et 4,9 environ. Ces valeurs sont en accord avec les données de la littérature. L'existence de deux maxima dans l'échelle des pH a été constatée dans les extraits de rate par Waldschmidt-Leitz et Deutsch qui l'ont attribuée à la complexité du système protéolytique en présence.

Les expériences que nous allons exposer à la suite ayant montré que la protéolyse s'intensifie quand on abaisse le potentiel d'oxydation-réduction du milieu, nous avons fait des expériences analogues aux précédentes, mais en présence d'un réducteur susceptible d'amener le potentiel vers sa valeur optimale. Des extraits de rate ont été partagés en deux parts ; dans l'une, on a introduit 0,2 gr. de sulfate ferreux par 35 $cm^3$ d'extrait. Nous avons choisi ce sel, car nos essais ont montré, en accord avec les données de Thiesse, que, même pour de fortes additions, le potentiel ne descend pas considérablement, et, d'autre part, ces additions presque massives ont l'avantage qu'on n'a pas à craindre une destruction du réactif dans le sens de l'anéantissement de son pouvoir réducteur par une

réaction parasite quelconque (oxydation, précipitation, etc...). Dans les deux parts d'extrait, le réduit et le témoin, nous avons ensuite éprouvé l'influence du pH dans deux séries conduites parallèlement. Les points expérimentaux montrent que les deux optimas de pH persistent en présence du réducteur, mais qu'ils sont indiscutablement déplacés vers des pH plus élevés (fig. 20). Le maximum à pH 4,8 du témoin correspond au minimum intermédiaire dans l'extrait réduit ; les optimas d'hydrolyse de celui-ci se situent aux environs de pH 4,3 et 5,6.

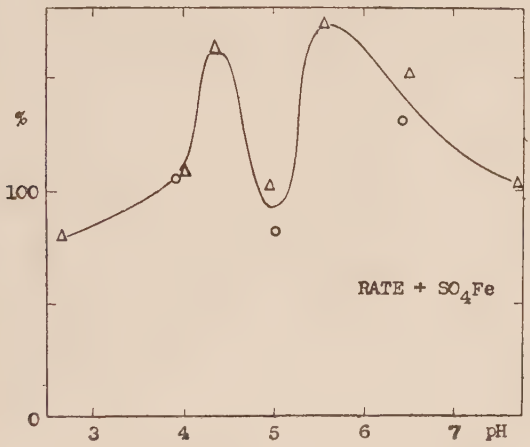


Fig. 20. — Expérience analogue à celle de la fig. 19, mais avec addition de sulfate ferreux dans le milieu.

Pour examiner l'influence du potentiel d'oxydation-réduction, nous avons fait quatre séries d'expériences. Dans chacune d'elles, nous avons amené les liquides initiaux à un pH déterminé, à savoir 3,8, 4,9, 6,0 ou 7,0 ; les échantillons d'une série ayant tous même pH ont été additionnés d'oxydants ou de réducteurs variés. Comme tels, nous avons employé le ferricyanure, le persulfate, le perborate, le chlorate et l'eau oxygénée d'une part, divers colorants réduits, l'hydrosulfite, le chlorure titaneux et le sulfate ferreux d'autre part. Ces échantillons ont été introduits dans les tubes décrits et maintenus 24 heures à 37° : la mesure des potentiels au début et à la fin de ce séjour à l'étuve montre une tendance spontanée à la réduction qui peut se traduire dans les lots non réduits au départ par des chutes de potentiel de l'ordre de 70 mV. La réduction se produit surtout au début de l'autolyse et s'amortit ensuite. Nous avons

donc considéré le potentiel final comme plus caractéristique que l'initial pour l'intensité de la protéolyse mesurée.

La formoltitration montre que la libération de groupements aminés par autolyse dépend du potentiel d'oxydation-réduction du milieu, mais que l'influence de ce potentiel n'est pas la même aux différents pH. Aux pH bas, on constate que la protéolyse est à peu près nulle dans les milieux oxydants (au-dessus de +600 mV). Tant que les potentiels demeurent dans une zone moyenne, la protéolyse est d'autant plus élevée que le potentiel est plus bas. Les témoins réalisés sans addition d'oxydants ni de réducteurs se placent habituellement dans cette zone moyenne. Le rendement de leur protéolyse varie donc très facilement avec le moindre changement (spontané, accidentel ou expérimental) du potentiel d'oxydation-réduction du milieu (1).

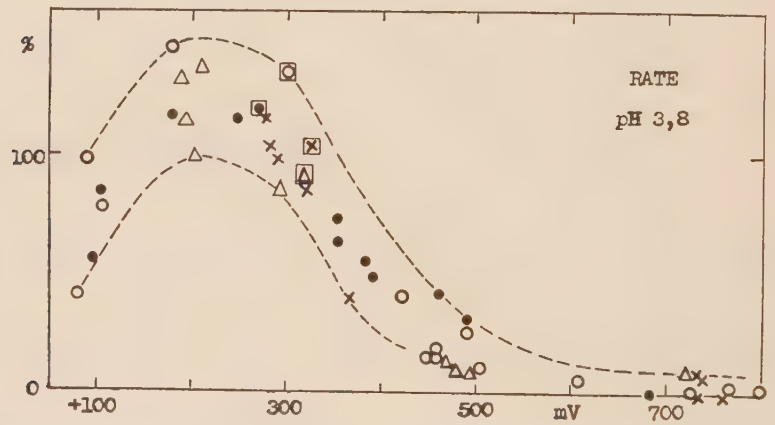


FIG. 21. — Activité autolytique de la pulpe de rate de Veau en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu, pH 3,8. (Voir note p. 47).

Par addition de réducteurs, quelle que soit leur nature, on atteint un maximum d'hydrolyse qui est situé aux environs de +200 mV pour pH 3,8 et aux environs de +100 mV pour pH 4,9. Quand on descend au-dessous de ces potentiels, l'hy-

(1) Il est probable que les écarts entre les résultats obtenus par différents auteurs, ou même par un auteur dans différentes séries d'expériences sur le même matériel, s'expliquent par une influence — non contrôlée — du potentiel. Le phénomène est, en effet, général dans toutes nos expériences : le potentiel s'installant spontanément dans les autolyses se place toujours sur une pente de la courbe donnant l'activité de la lyse en fonction du potentiel du milieu. La moindre intervention expérimentale et même des détails de la technique susceptibles de modifier ce potentiel retentiront donc sur le rendement de la lyse observée.

drolyse diminue très rapidement (fig. 21 et 22). A pH 6,2, les variations de l'autolyse en fonction du potentiel sont moins nettes, l'optimum est moins bien défini (fig. 23).

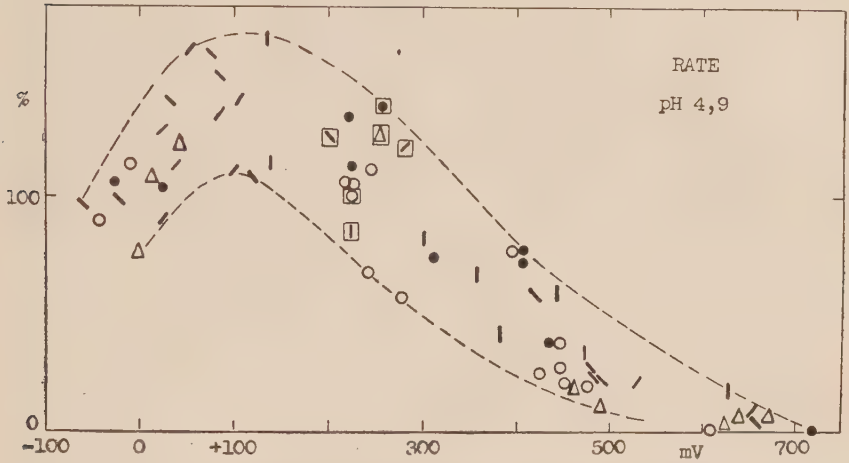


Fig. 22. — Expérience analogue à celle de la fig. 21, pH 4,9.

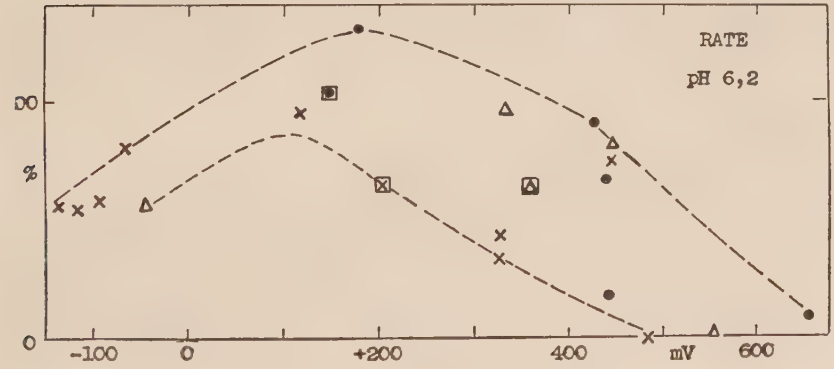


Fig. 23. — Expérience analogue à celle de la fig. 21, pH 6,2.

A pH 7, le rendement de l'autolyse est relativement faible et, en plus, moins constant d'une expérience à l'autre. L'influence d'une variation du potentiel d'oxydation-réduction se manifeste beaucoup moins régulièrement qu'aux pH optima de l'hydrolyse. On distingue néanmoins une intensification par abaissement du potentiel.

**Cristallin et corps vitré de veau et de Boeuf.**

Le cristallin se présente favorablement pour nos recherches en ce sens qu'il est relativement homogène et très riche en protéines (environ 35% du poids frais, Moerner). En outre, ces protéines ne sont pas inertes, mais paraissent en transformation continuelle : la part des différents constituants protéiques varie régulièrement avec l'âge de l'individu. On peut donc soupçonner la présence de protéinases. La littérature (voir Nordmann et Rerss, 1938) montre l'existence dans le cristallin de quantités considérables de corps qui pourraient jouer le rôle d'activateurs, tels l'acide ascorbique, le glutathion réduit, la vitamine $B_2$ et d'autres.

La technique de mise en évidence de la protéolyse est la suivante : le cristallin est broyé soigneusement et mis en suspension dans du sérum physiologique (20 cm³ par cristallin de Bœuf pesant en moyenne 2,4 gr., 10 cm³ par cristallin de veau). Le liquide est décanté ou filtré, additionné de toluène et porté 40 heures à l'étuve à 37°. Dans quelques expériences préliminaires, on fait varier le pH de lots ainsi préparés pour déterminer le pH optimum de l'autolyse mesurée par formoltitration. L'expérience 3 donne un exemple d'une telle série :

Expérience 3. Cristallin de veau.

| Cristallin de veau | pH | Formoltitration cm³ NaOH n/25/2 cm³ |
|---|---|---|
| Témoin glacière. ..... | 7,05 | 0,37 |
| Etuve, sans addition. ..... | 7,05 | 0,38 |
| + HCl..... | 6,5 | 0,44 |
| — ..... | 6,3 | 0,40 |
| — ..... | 5,0 | 0,38 |
| — ..... | 4,45 | 0,38 |
| + NaOH ..... | 9,0 | 0,38 |
| — ..... | 9,7 | 0,37 |

D'autres séries précisent ce résultat en fixant l'optimum de l'autolyse à pH 6,5.

A ce pH on réalise des séries à potentiel variable soit par addition de ferricyanure de K, d'eau oxygénée neutralisée, d'hy-

drosulfite de Na, de sulfate ferreux ou d'acide ascorbique neutralisé, soit par le simple conditionnement des lots. On connaît en effet les phénomènes de réduction qui se déclenchent spontanément dans la masse cristallinienne après broyage au contact de l'air (voir Reiss et Nordmann). Le potentiel qui s'établit dans la purée de cristallin résulte donc d'un équilibre entre la production de corps réducteurs et leur oxydation à l'air. Suivant qu'on place les lots préparés dans les tubes à l'abri de l'air ou au contraire dans des récipients à plus ou moins grande surface de contact avec l'air, on peut donc obtenir une gamme de potentiels qui s'installent assez rapidement. Nous donnons une expérience typique (n° 15) ainsi réalisée.

Expérience 15. Cristallin de veau, pH amené à 6,5.

| | Potentiel en mV | Formoltitration : en cm³ NaOH n/25 par 2 cm³ avant — après addition de formol | |
|---|---|---|---|
| Témoin glacière ..... | | 0,13 | 0,27 |
| Etuve, tube large..... | +232 | 0,09 | 0,32 |
| — étroit. ..... | +182 | 0,10 | 0,33 |
| Etuve, tube fermé sans air ..... | —185 | 0,17 | 0,31 |
| Etuve, tube fermé avec air ..... | — 15 | 0,19 | 0,35 |
| Etuve + hydrosulfite... | + 46 | 0,10 | 0,31 |
| Etuve + ferricyanure (trace)..... | +315 | 0,11 | 0,30 |
| Etuve + ferricyanure (quantité plus forte). .. | +450 | 0,17 | 0,28 |
| Un lot de la même série est maintenu en étuve et des prélèvements sont faits en vue du dosage : | | | |
| Dosage après 5 heures .. | +207 | 0,08 | 0,33 |
| — 8 jours.... | | 0,15 | 0,42 |
| — 16 jours.... | | 0,12 | 0,44 |
| — 25 jours.... | +230 | 0,07 | 0,47 |

Cette expérience montre que l'autolyse se poursuit très longtemps et que, dans les séries habituelles, les variations des résultats des dosages relèvent de différences de vitesse de lyse et non de différences d'équilibres finaux.

La même expérience montre l'influence du potentiel sur cette vitesse. L'ensemble des séries faites avec le cristallin de veau (fig. 24) met en évidence une inhibition complète à +500 mV, une lyse d'autant plus rapide que le potentiel est plus bas en dépassant le potentiel qui s'installe spontanément dans le milieu aéré. On atteint un optimum pour des potentiels de l'ordre de +50 mV ; au-delà, et jusque vers —250 mV, les lyses sont de plus en plus faibles. L'optimum correspond à la libération d'environ $1.10^{-4}$ équivalents de liaisons peptidiques hydrolysées par cristallin, ce qui est très inférieur à ce qu'on obtient par une digestion trypsique.

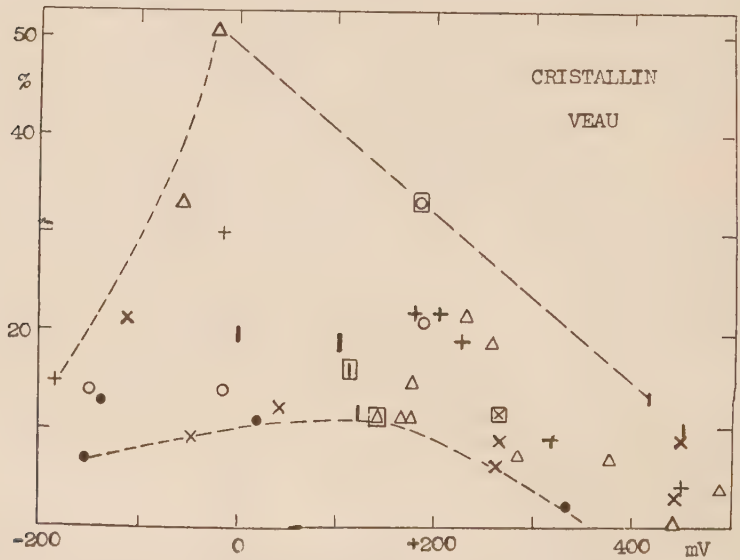


Fig. 24. — Activité autolytique d'une suspension aqueuse de cristallin de veau en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu. (Voir note p. 47.).

Le cristallin de Bœuf se comporte approximativement de la même façon : l'optimum de pH est le même, la lyse se poursuit pendant fort longtemps, on note par exemple une augmentation de l'azote formoltitrable de 1% en 24 heures, de 5% en 48 heures et de 27% en 10 jours. Mais ce qui distingue le cristallin de Bœuf de celui de veau, c'est le rendement bien plus faible de la lyse. L'optimum, moins bien défini, se situe à un potentiel plus élevé (fig. 25.).

Pour le corps vitré, le matériel de départ de nos expériences a été préparé par dissection du globe, séparation du vitré en évitant d'entraîner des fragments de rétine, découpage aux ci-

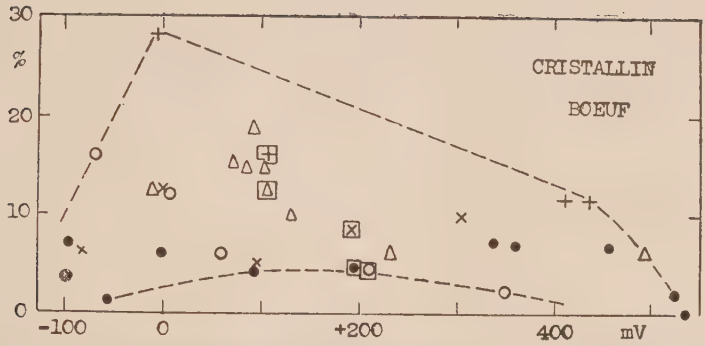


FIG. 25. — Expérience analogue à celle de la fig. 24, avec du cristallin de Bœuf.

seaux et filtration sur papier. L'optimum de l'autolyse est à pH 7 environ. Elle semble atteindre un état stationnaire après 5 jours. Nos séries d'expériences comportent 40 heures d'étuve. Un exemple montre comment se présente l'influence du potentiel sur cette autolyse.

Expérience 26. Vitré de Bœuf.

| | Potentiel | | Formoltitration $cm^3$ NaOH n/25 sur $2cm^3$ | |
|---|---|---|---|---|
| | après 20 heures en mV | après 40 heures en mV | avant | après addition de formol |
| Témoin glacière. . . . . | | | 0,03 | 0,23 |
| Etuve, tube ouvert . . . . . | | +230 | 0 | 0,27 |
| — fermé. . . . . | — 45 | — 55 | 0 | 0,29 |
| Etuve + hydrosulfite. . . . . | + 55 | + 36 | 0 | 0,28 |
| Etuve + hydrosulfite, quantité plus forte. . . . . | | —240 | 0 | 0,26 |
| Etuve + hydrosulfite en solution neutralisée. . . . . | — 40 | — 45 | 0,03 | 0,27 |
| Etuve + hydrosulfite, quantité plus forte. . . . . | —275 | —203 | 0,02 | 0,23 |
| Etuve + ferricyanure. . . . . | +445 | | 0,05 | 0,25 |
| Etuve + $H^2O^2$. . . . . | +480 | | 0,02 | 0,23 |

Il y a donc un optimum dans l'échelle des potentiels qui est précisé par l'ensemble de nos séries (fig. 26). Les phéno-

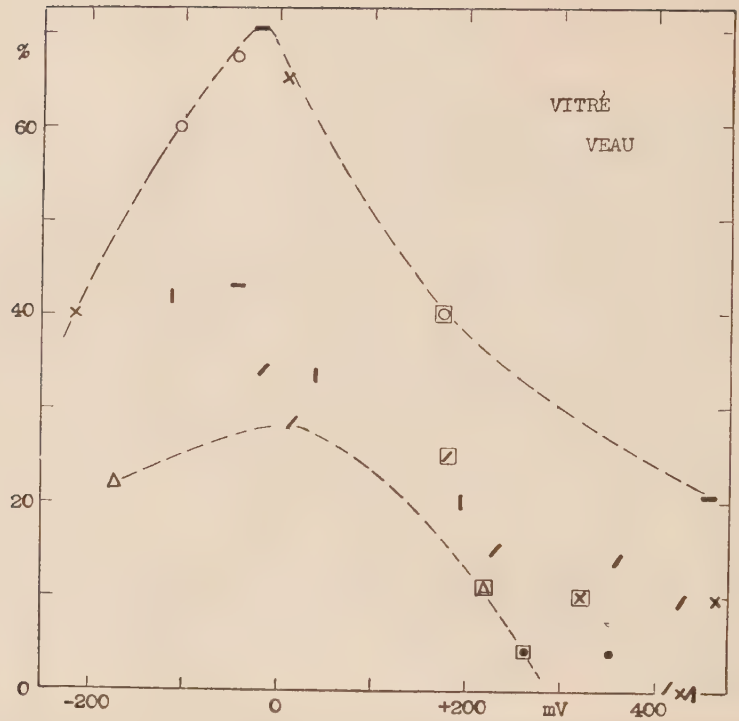


FIG. 26. — Activité autolytique de corps vitré de veau en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu. (Voir note p. 47).

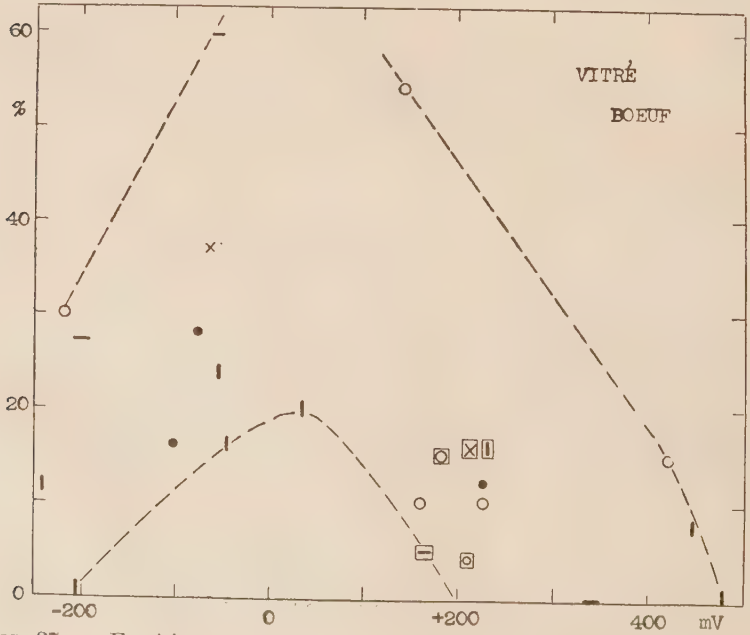


FIG. 27. — Expérience analogue à celle de la fig. 26, avec du corps vitré de Bœuf.

mènes sont assez comparables avec ce que nous venons de voir pour le cristallin. Le rendement est plus fort pour le veau que pour le Bœuf. Les moyennes des expériences établissent l'optimum à —50 mV pour le veau et à 0 mV pour le Bœuf (fig. 27).

---

**Action d'extraits d'hépatopancréas sur la gélatine.**

Nous avons fait appel à l'hépatopancréas de la Seiche (*Sepia officinalis* L.), du Poulpe (*Octopus vulgaris* Lm) et d'un Crabe (*Carcinus maenas*). Cet organe est, en effet, riche en ferments intra-cellulaires. Nous avons fait agir les extraits sur de la gélatine.

L'hépatopancréas de Seiche est broyé au mortier et centrifugé ; 4 cm³ du liquide brun trouble surnageant sont additionnés de 30 cm³ d'une solution de citrate de Na m/5, de 15 cm³ d'une solution de gélatine à 10% fondue au bain-marie, de toluène et amenés à 60 cm³. Des lots de ce milieu sont portés à différents pH et laissés ensuite 72 heures à l'étuve à 37°. Ces expériences mettent en évidence un optimum de digestion entre pH 6,3 et 7,2 différent de ceux signalés par Sawano (pH 4,6 et 7,9). Sur des milieux identiques amenés à pH 6,5, on éprouve ensuite dans les conditions habituelles l'influence du potentiel d'oxydation-réduction. Nous n'avons fait que deux séries d'expériences qui ne nous ont pas permis de stabiliser des lots à des potentiels moyens. En partant de potentiels très bas (—200 mV), d'une part, et de potentiels très élevés (+600 mV), d'autre part, vers la zone moyenne la digestion de la gélatine s'intensifie. Il doit donc y avoir un optimum dont nous ne pouvons cependant pas préciser la valeur.

Pour le Crabe, nous avons préparé un extrait glycériné d'hépatopancréas (15 glandes broyées pesant 30 g. + 60 g. de glycérine) : 10 cm³ de cet extrait sont additionnés de 25 cm³ de tampon de phosphates, de 25 cm³ de gélatine à 10%, de toluène et amenés à 100 cm³. L'optimum de pH est près de la neutralité. La digestion est lente : elle n'est terminée à pH 7,8 que vers le 30e jour. Nous avons étudié l'action du potentiel d'oxydation-réduction sur des lots laissés trois jours à l'étuve ce qui correspond à environ un tiers de la digestion totale. L'influence du potentiel du milieu se présente exactement comme pour la Seiche.

Pour le Poulpe, nous nous sommes également servi d'un extrait glycériné. L'optimum de pH se situe aux environs de pH 8. Comme tampons de pH nous avons utilisé des phosphates ou des borates : des séries conduites parallèlement avec ces deux sels ont donné les mêmes résultats ; il ne semble donc pas y avoir d'influence spécifique du tampon introduit dans le milieu. L'influence du potentiel d'oxydation-réduction a été éprouvée dans des séries d'expériences plus nombreuses (fig. 28) à pH 7,3. Comme dans les séries précédentes, le rendement augmente quand on s'approche de la zone des potentiels faiblement

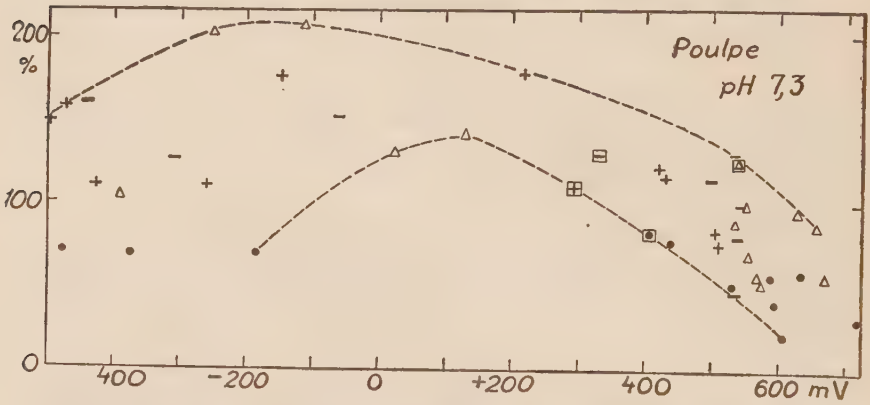


Fig. 28. — Hydrolyse de la gélatine par un extrait d'hépatopancréas de Poulpe, pH 7,3, en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu. (Voir note p. 47).

réducteurs, il présente un optimum, cependant mal défini, aux environs de —100 mV. Les témoins réalisés sans addition d'aucun réactif se placent sur la branche descendante de la courbe et pas très loin de la limite supérieure de potentiel compatible avec l'activité des ferments protéolytiques.

---

**Pepsine.**

A titre de renseignement utile pour la discussion de nos résultats et bien que notre programme ne comportât que l'étude de protéinases intratissulaires nous avons examiné le comportement de la pepsine vis-à-vis de variations du potentiel d'oxy-

dation-réduction du milieu. Nous avons fait agir de la pepsine brute sur du blanc d'œuf séché remis en solution à 2% ou sur de la gélatine. L'optimum de pH dans ces conditions est aux environs de 2. L'addition de divers réactifs (notamment de chlorure de titane et eau oxygénée) fait varier le potentiel du milieu dans de larges limites. Or, dans tout le domaine de potentiel exploré : entre —168 et +770 mV à pH 2 environ, l'intensité de la digestion correspondant à 3 heures de séjour à 37° est absolument constante. Nous donnons 2 expériences à titre d'exemple.

Expérience 102. — Gélatine, pepsine sèche 5%, HCl pour amener à pH2. 5 heures à 37°.

| | Potentiel final en mV | Formoltitration en cm³ NaOH n/25 par cm³ |
|---|---|---|
| Témoin glacière. . . . | | 0,35 |
| Etuve, sans addition | + 430 | 0,50 |
| Etuve + $H^2O^2$ . . . | + 780 | 0,50 |
| Etuve + chlorure titaneux . . . . . | + 425 | 0,50 |
| Etuve + chlorure, quantité plus forte | — 140 | 0,50 |
| Etuve + chlorure, quantité plus forte | — 168 | 0,50 |

Expérience 106. — Blanc d'œuf séché 2%, pepsine 4%, HCl pour amener à pH 1,5 à 2,0, 5 heures à 37°.

| | Potentiel final en mV | Formoltitration cm³ |
|---|---|---|
| Témoin glacière. . . . | | 1,60 |
| Témoin glacière + NaOH . . . . . | | 1,50 |
| Etuve . . . . . | + 520 | 2,40 |
| Etuve + $H^2O^2$. . . . | + 724 | 2,35 |
| Etuve + chlorure titaneux. . . . . | + 486 | 2,45 |
| Etuve + chlorure, quantité plus forte | + 146 | 2,40 |
| Etuve + chlorure, quantité plus forte | — 18 | 2,40 |

## DISCUSSION

### Discussion de la technique.

L'utilisation des systèmes enzymatiques complexes (enzyme + substrat), tels qu'on les extrait des tissus sans aucune fragmentation, nous a fourni des résultats expérimentaux relativement simples. La séparation artificielle d'enzymes bien définis et l'utilisation de substrats synthétiques conduirait en effet à des résultats plus complexes. Nous n'en voulons pour preuve que deux exemples : Fruton et Bergmann montrent que l'acide ascorbique active un enzyme protéolytique obtenu à l'état purifié à parfir de rate, à la condition que le substrat ait un groupement $\alpha$- aminé libre ; les expériences d'Anson séparent dans le système protéolytique des tissus une protéinase insensible à la cystéine et à l'acide iodacétique d'une peptidase sensible à ces deux corps.

En plus, l'utilisation du système enzymatique total avec son substratum naturel et tous les facteurs accessoires éventuellement contenus dans le tissu place, en effet, nos expériences le plus près possible de ce qui se passe dans l'organisme vivant. Les résultats obtenus ont un intérêt physiologique immédiat et pouvant servir à l'interprétation du fonctionnement des enzymes dans l'organisme.

Si l'établissement de potentiels variés dans nos expériences par les modifications des conditions d'aération respecte encore notre désir de maintenir aux enzymes leur ambiance normale, l'addition d'oxydants ou de réducteurs minéraux semble à première vue porter entrave à ce principe. Cependant, nous n'avons pu relever, pour les concentrations très faibles utilisées, aucune action toxique spécifique de ces corps sauf peut-être pour la quinone que nous avons ensuite abandonnée (1).

(1) Fischgold étudie l'action d'oxydants et de réducteurs sur l'uréase qui s'y montre tout à fait insensible. La quinone et l'hydroquinone cependant l'inhibent, mais Fischgold attribue leur action à une réaction chimique et non à l'établissement d'un certain potentiel dans le milieu.

Les expériences sur la pepsine montrent à la fois l'insensibilité au potentiel de cet enzyme et l'absence de toute action toxique des réactifs utilisés. En présence de ces réactifs la pepsine a, en effet, la même activité que dans les témoins. Les corps ajoutés agissent manifestement dans nos expériences par le niveau de potentiel qu'ils fixent dans le milieu, car les points expérimentaux se rangent sur les graphiques suivant le potentiel atteint et non suivant la nature chimique du réactif ayant servi à modifier le potentiel. La même quantité de réactif peut, dans deux séries d'expériences, réaliser des potentiels différents : le rendement de la protéolyse correspond au potentiel. En plus, les résultats obtenus par fermeture en absence d'air des tubes, par introduction d'un activateur physiologique et qui est un réducteur en même temps, tel l'acide ascorbique ou encore par addition d'un réducteur minéral se confondent. C'est en raison de ces constatations que nous nous sommes cru autorisé à considérer le potentiel d'oxydation-réduction comme variable intervenant en premier lieu dans nos expériences à pH constant. Les phénomènes sont donc analogues à ce qui se passe dans l'échelle des pH où également la nature de l'acide ou de la base n'intervient pas, au moins en première approximation. Il est probable qu'une analyse plus fine, mais qui est impossible avec nos résultats, montrerait pour les potentiels la même complication que pour le pH par la superposition d'actions spécifiques.

On peut se demander, en discutant nos expériences, par quel mécanisme l'action du cyanure aboutit dans certains cas au même résultat qu'une activation par abaissement de potentiel bien que le cyanure ne soit pas un réducteur dans le sens chimique du mot. Certaines données nous apportent peut-être une explication : le potentiel caractéristique d'équilibres bien définis comme le système ferri-ferrocyanure est déplacé en présence de cyanure (Masaki et Ikkatai). La fixation de CN sur la méthémoglobine abaisse le potentiel d'équilibre d'oxydation-réduction de ce corps de 303 mV (Barnard). Mais peut-être le cyanure agit-il aussi par des phénomènes secondaires, il joue en effet un rôle important dans certaines réactions enzymatiques d'oxydation et de réduction.

On constate que nos valeurs expérimentales ne définissent une courbe qu'avec une certaine approximation. Nous n'attribuons pas ce flottement à un manque de précision de la technique : des dosages de contrôle exécutés maintes fois nous ayant toujours confirmé une exactitude très satisfaisante. Nous croyons plutôt que les résultats obtenus dans différentes séries ou même dans les différents lots d'une série ne sont pas absolument concordants en raison de la difficulté qu'on éprouve

à fixer les différentes variables intervenant dans le décours d'une réaction enzymatique en milieu complexe. La réaction étudiée elle-même, et surtout d'autres réactions évoluant en même temps peuvent faire varier le pH, le potentiel d'oxydation-réduction et d'autres caractéristiques du milieu. Ces réactions parasites sont évidemment spécialement importantes dans des expériences d'autolyse et ont maintes fois gêné des recherches même plus simples que celles que nous avons entreprises (voir par exemple KLEMEN et STUCIN). Il ne faut pas oublier, en outre, que les ferments des tissus ne sont pas des systèmes fixes. GOLDSTEIN qui a consacré une recherche aux protéinases extraites de différents tissus note expressément que leur activité varie suivant les conditions, y compris l'âge de l'animal, la saison, etc... Et suivant les cas, les activateurs agiraient différemment, comme d'autres auteurs (par exemple ORECHOWITSCH, WEIL et RUSSELL) l'ont également constaté. Nos résultats obtenus sur le veau et le Bœuf ne se superposent d'ailleurs pas.

Nous ne revenons pas sur la valeur de la formoltitration comme méthode d'investigation. Nous croyons avoir établi, dans un chapitre précédent, sinon sa supériorité, au moins ses avantages du fait de sa précision, de sa fidélité et de la signification fondamentale de l'azote formoltitrable pour nos recherches. Mais nous devons nous demander ce que signifie la variation de l'hydrolyse des liaisons peptidiques que nous mesurons. Il ne s'agit pas d'une modification de l'équilibre final, mais d'une variation de vitesse de réaction, car dans aucune de nos séries l'équilibre final n'était atteint dans les lots ayant servi à l'établissement des courbes de rendement en fonction du potentiel. Nous avons toujours vérifié que la digestion n'était pas achevée au moment de nos dosages en série. Nous avons consigné des données à ce sujet dans la partie expérimentale de notre exposé. Le taux atteint a d'ailleurs été variable suivant les systèmes étudiés. Nous avons pu approcher de l'équilibre final avec la papaïne pour laquelle l'inhibition est complète au-dessus d'un certain potentiel ; nous en sommes resté plus loin (au tiers du rendement total possible, par exemple) avec d'autres systèmes pour éviter les phénomènes plus compliqués que la détermination d'un équilibre final aurait entraînés.

Il faut encore se demander quel est le mécanisme des inhibitions dans les milieux à potentiels extrêmes. S'agit-il d'une inhibition dans le sens strict du mot, c'est-à-dire d'un phénomène réversible par retour aux potentiels optimaux, ou s'agit-il d'une destruction irréversible ? On sait en effet que dans l'échelle des pH les deux mécanismes existent. Nous citons

comme exemple l'étude de la tyramine-oxydase par HARE : la chute d'activité aux pH bas est une inhibition réversible par retour au pH optimum, alors qu'au-dessus de pH 10, le ferment se détruit irréversiblement ; les deux branches de la courbe en cloche donnant l'activité en fonction du pH n'ont donc pas la même signification. En ce qui concerne l'intervention des phénomènes d'oxydation et de réduction, nous savons déjà que l'action de certains oxydants est réversible. Cependant les auteurs n'avaient pas précisé quel potentiel ils avaient atteint dans leurs expériences. Nous avons donc éprouvé la réversibilité des actions inhibitrices des potentiels extrêmes que nous avons observées.

Voici une expérience faite avec du cristallin de veau mis en suspension et amené à pH 6,5. Un lot témoin de la suspension est conservé à la glacière, un autre porté à l'étuve. Une troisième portion est additionnée de ferricyanure et répartie en plusieurs lots dont l'un est placé à la glacière, un autre à l'étuve, le reste de la suspension oxydée est placé trois heures à l'étuve, ensuite réduit à l'hydrosulfite et réparti en plusieurs lots conditionnés de différentes façons et remis à l'étuve. Voici les résultats de cette expérience :

Cristallin de veau, pH 6,5.

| | Potentiel final en mV | Formoltitration cm³ NaOH n/25 pour 2 cm³ | |
|---|---|---|---|
| 1° Témoin glacière. . | | | 1,10 |
| 2° Témoin étuve.... | + 174 | 0,37 | 1,22 |
| Lots oxydés au ferricyanure à + 460 mV : | | | |
| 3° Glacière..... | + 428 | 0,52 | 1,11 |
| 4° Etuve..... | + 370 | 0,58 | 1,07 |
| Lots oxydés et ensuite réduits : | | | |
| 5° Etuve, lot ouvert. | + 260 | 0,60 | 1,20 |
| 6° Etuve, lot fermé.. | + 115 | 0,63 | 1,23 |

L'action du ferricyanure ayant maintenu la suspension pendant 3 heures à 40° aux environs de +150 mV et ayant bloqué toute hydrolyse dans le milieu (lot 4) est donc réversible par simple réduction et malgré la présence du ferrocyanure qui en résulte. Les lots ainsi obtenus (5 et 6) montrent, en effet, la même lyse que celui (2) qui avait été placé à l'étuve sans autre addition.

Un autre exemple de réversibilité a trait à l'hydrolyse du corps vitré qui avait été inhibée par l'eau oxygénée.

Corps vitré de veau filtré et amené à pH 7.

| | Potentiel final en mV | Formoltitration cm³ NaOH n/25 pour 2 cm³ | |
|---|---|---|---|
| 1° Témoin glacière.. | + 270 | 0,04 | 0,25 |
| 2° Lot oxydé par $H^2O^2$, étuve. .... | + 402 | 0 | 0,28 |
| Lots oxydés (comme 2) maintenus 2 h. 1/2 à l'étuve à 40° et ensuite réduits à l'hydrosulfite : | | | |
| 3° Lot ouvert. ..... | + 310 | 0 | 0,30 |
| 4° Lot fermé..... | + 125 | 0,10 | 0,35 |
| 5° Lot fermé après addition supplémentaire d'hydrosulfite ..... | + 89 | 0,10 | 0,48 |
| 6° Lot id. mais ouvert. . ..... | + 140 | 0,04 | 0,25 |

L'inhibition de la lyse par $H^2O^2$ (lot 2) est donc réversible et montre la même influence du potentiel (lots 3 à 6) que celle que nous avons mise en évidence sur des lots n'ayant pas subi d'oxydation préalable.

Nous citerons enfin un essai fait sur les tissus de l'Arénicole et qui montre la réversibilité de l'inhibition par abaissement du potentiel. Une suspension produite dans les conditions indiquées plus haut demande à la formoltitration 1,70 cm³ de NaOH n/25 avant la mise en expérience. Réduite par addition d'hydrosulfite à —76 mV et dosée après 24 heures, elle exige 1,75 cm³ alors qu'un témoin ayant subi l'hydrolyse à +314 mV atteint 1,95 cm³. Après ce dosage, des échantillons du lot réduit sont réoxydés à l'air et amenés ainsi à +305 et +295 mV. Dans les deux, la formoltitration, après un nouveau délai de 24 heures, exige 1,95 cm³ de NaOH. Après l'inhibition pratiquement complète, la digestion a donc pu reprendre à la suite du changement de potentiel du milieu avec la même intensité que dans le témoin non traité.

Par conséquent, les inhibitions aussi bien par les potentiels

élevés que par les potentiels bas peuvent être considérés comme réversibles et nous pourrons interpréter les *courbes obtenues* comme *traduisant réellement l'activité du système enzymatique en fonction du potentiel d'oxydation-réduction.*

---

**Discussion des résultats du point de vue physico-chimique.**

Pour discuter l'ensemble des résultats obtenus, il y a lieu de faire la distinction entre les autolyses vraies et les hydrolyses fermentaires utilisant un substrat étranger (gélatine ou blanc d'œuf). C'est sur l'étude des premières qu'a porté notre principal effort. Les résultats détaillés plus haut présentent un certain nombre de caractères communs. Très sensibles au potentiel d'oxydation-réduction du milieu, toutes les autolyses examinées présentent un maximum d'activité dans l'échelle des potentiels. A des potentiels extrêmes, notamment du côté des potentiels élevés, l'activité est totalement inhibée. Pour faciliter la comparaison, nous prenons les moyennes, par tranches de potentiel de 100 mV, des valeurs expérimentales consignées dans nos graphiques. Nous les exprimons en rH en utilisant la formule classique

$$rH = \frac{\text{Potentiel en Volt} + 0{,}058\ pH}{0{,}029}$$

Il apparaît alors que les courbes donnant, en fonction du rH, l'activité de lyse pour le même système à différents pH sont absolument superposables comme le montrent les figures 29, 30 et 31. C'est donc le rH qui est la véritable variable de nos expériences.

Il y a mieux : si nous superposons l'ensemble des courbes ainsi tracées, elles paraissent groupées dans l'échelle des rH. Les optima sont rassemblés autour de rH 14 avec des écarts ne dépassant guère 3 unités (voir tableau p. 119). Nous avons tracé leur polygone de fréquence (fig. 32) qui ne permet pas absolument d'affirmer qu'il s'agit d'une valeur théorique unique avec une dispersion accidentelle des valeurs expérimentales ; le polygone présente, en effet, un type bimodal.

Nous relevons encore sur nos courbes moyennes (fig. 32)

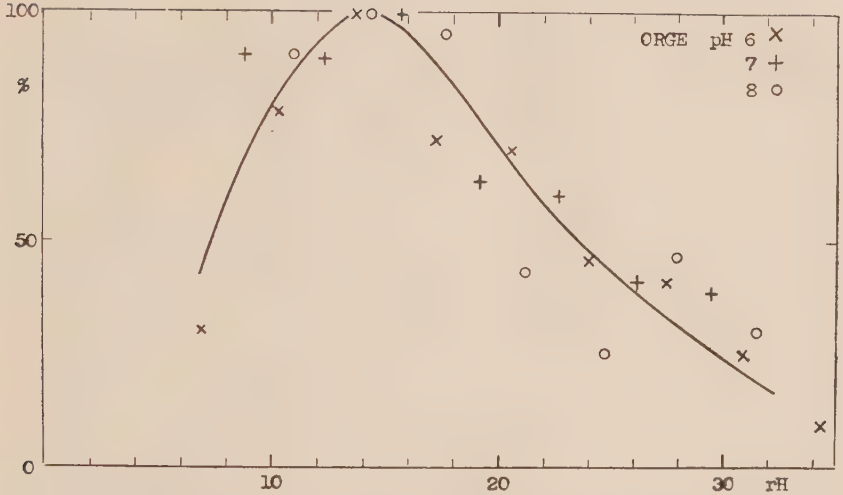


Fig. 29. — Activité autolytique de l'extrait aqueux d'Orge en fonction du rH du milieu. En abscisses le rH, en ordonnées l'azote formoltitrable libéré en p. cent du maximum obtenu. Chaque point représente la moyenne des points expérimentaux par tranches de 100 mV dans les séries d'expériences rapportées dans les figures 8, 9 et 10.

× = expériences réalisées à pH 6, + = expériences réalisées à pH 7, o = expériences réalisées à pH 8.

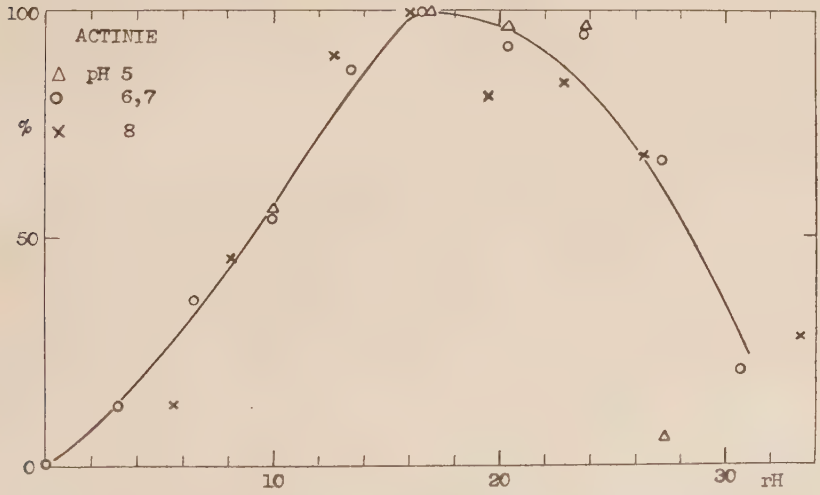


Fig. 30. — Activité autolytique de l'extrait de paroi d'Actinie en fonction du rH du milieu. En abscisses le rH, en ordonnées l'azote formoltitrable en p. cent du maximum obtenu. Chaque point représente la moyenne des points expérimentaux par tranches de 100 mV dans les séries d'expériences rapportées dans les figures 12, 13 et 14.

Δ = expériences réalisées à pH 5; o = expériences réalisées à pH 6,7; × = expériences réalisées à pH 8.

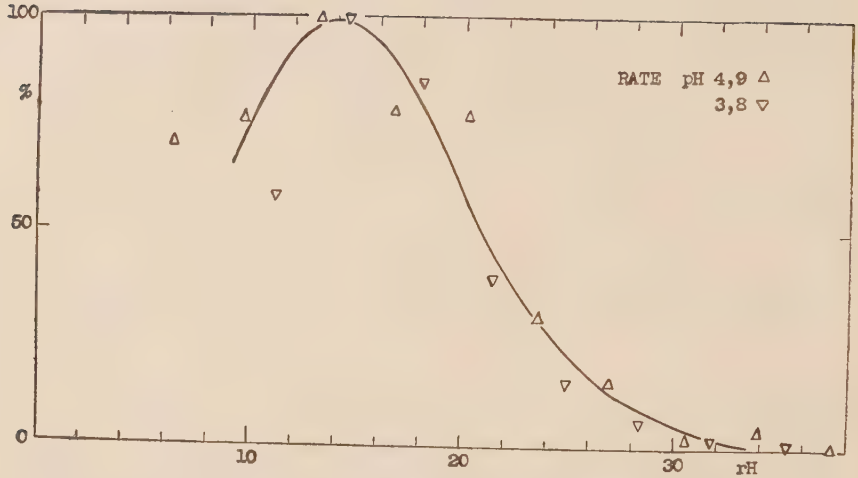


FIG. 31. — Activité autolytique de pulpe de rate en fonction du rH du milieu. En abscisses le rH, en ordonnées l'azote formoltitrable libéré en p. cent du maximum obtenu. Chaque point représente la moyenne des points expérimentaux par tranches de 100 mV dans les séries d'expériences rapportées dans les fig. 21 et 22.
Δ = expériences réalisées à pH 4,9, ▽ = expériences réalisées à pH 3,8.

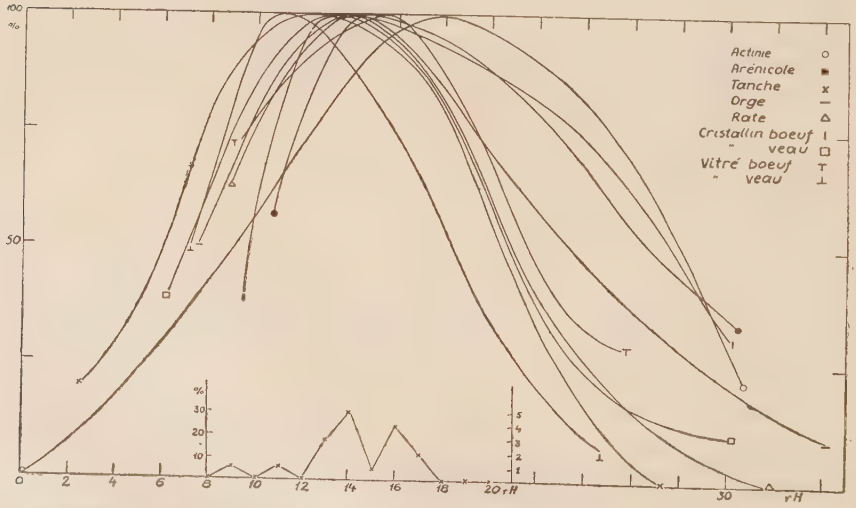


FIG. 32. — Courbes moyennes d'activité de divers systèmes d'autolyse protéique en fonction du rH ; les ordonnées expriment le rendement en p. cent du maximum. En bas de la figure polygone de fréquence des valeurs de rH optimum (voir tableau IV, p. 119) ; l'échelle des ordonnées exprime à gauche le nombre en p. cent du nombre total, à droite en valeur absolue.

les valeurs de la variable correspondant à la réduction de moitié de l'activité maximale. Ces valeurs, portées dans notre tableau d'ensemble, sont plus dispersées que les optima, mais semblent se grouper autour de quelques chiffres moyens, à savoir rH 7 et 10 du côté réducteur et 21 et 27,5 du côté oxydant.

On peut chercher pourquoi, après élimination du flottement signalé des points expérimentaux par l'utilisation des moyennes, de grands écarts apparaissent dans la superposition des résultats obtenus avec des matériaux divers. S'agit-il de différences dues à ce que chaque système étudié présente ses caractéristiques propres ou s'agit-il d'écarts accidentels par rapport à une courbe théorique ? Assez d'arguments permettraient de justifier les écarts dans la seconde hypothèse : le manque de précision des chiffres utilisés pour l'établissement des moyennes peut encore retentir sur leur valeur. En plus les différents systèmes n'ont pas qualitativement et surtout quantitativement les mêmes causes d'erreur : l'évolution spontanée du potentiel au cours du séjour à l'étuve, très variable d'un cas à l'autre, fausse plus ou moins les valeurs de potentiel données. Les systèmes se modifient en cours de lyse par des réactions fermentaires ou autres concomitantes, libération ou destruction d'activateurs par digestion, etc... ; l'ensemble de ces réactions n'a pas la même importance quantitative, peut-être même n'agit-il pas toujours dans le même sens sur la protéolyse dans les différents systèmes étudiés ; les réactions parasites peuvent dépendre elles-mêmes du potentiel : l'activité de la protéolyse peut donc être modifiée et présenter ainsi des écarts par rapport à ce qu'elle serait si elle évoluait seule. Nous sommes ainsi tenté de considérer que *toutes les autolyses protéiques étudiées*, malgré la diversité de leur provenance, *correspondent à un même mécanisme caractérisé notamment par un optimum à rH* 14.

Un autre raisonnement encore nous conduit vers un résultat semblable. Les méthodes d'analyse spectrale mises au point par Vlès permettent d'utiliser les pK (en rH) des courbes d'activité dans l'échelle d'oxydation-réduction en passant par les bandes d'absorption infra-rouge (pK=21,2 λ) pour interpréter la nature des fonctions organiques en jeu. Les points d'inflexion (pK) des courbes que nous donnons se groupent autour de rH 7 ; 10 ; 21 et 27,5. Les longueurs d'onde correspondantes calculées d'après la formule de Vlès sont de 3,03 ; 2,12 ; 1,0 et 0,77 μ. Du tableau de Vlès, nous extrayons les longueurs d'onde les plus rapprochées avec les groupements dont elles sont indicatrices : 2,98 μ —N= ;

3,2 μ =C=O ; 2,0 μ =C=O ; 2,1 μ —N= ; 1.04 μ —N=. Nous désignons ainsi les fonctions intéressées par l'hydrolyse des protéines. Ce résultat nous fait conclure que les interventions étudiées touchent les liaisons peptidiques hydrolysables du substratum plutôt que des fonctions inconnues des enzymes ou des activateurs et expliquent de ce fait l'homogénéité relative de nos résultats. Il n'y a pas lieu de s'étonner que le potentiel d'oxydation-réduction intervienne sur les caractéristiques physico-chimiques des liaisons peptidiques. Friedenwald et Stiehler ont développé une théorie de l'action du potentiel du milieu sur le point isoélectrique des ampholytes et Vlès a concrétisé par une formule les interactions possibles du pH, du rH et de la massivité.

Les conclusions que nous venons de tirer ne s'appliquent évidemment pas à la pepsine qui est insensible au potentiel du milieu et probablement pas à la papaïne qui ne présente pas d'optimum, mais un potentiel d'arrêt. Celui-ci, établi entre pH 4,8 et 6,8, définit la valeur de rH = 23,3 ± 0,5 qui correspond à λ = 0,91 μ. Cette longueur d'onde pourrait représenter le deuxième terme de la série du soufre (λ = 0,956 μ). L'arrêt de la digestion papaïnique serait donc plutôt le fait de l'enzyme que celui du substrat étant donné l'importance du groupement —SH pour l'activité de la papaïne. On confirmerait ainsi l'hypothèse de Bersin qui, en 1936, interprétait le potentiel d'arrêt que nous avions déterminé comme potentiel caractéristique de l'équilibre thiol-disulfure de la papaïne.

Nous voudrions encore relever la signification d'une de nos expériences que nous n'avons pas approfondie, mais qui permet d'entrevoir que le problème que nous avons abordé n'est pas entièrement résolu par les séries que nous avons faites à des pH déterminés. Ces pH correspondent à l'optimum de lyse dans des milieux réalisés sans oxydants ni réducteurs. Or une expérience faite sur la pulpe de rate et que nous avons relatée (p. 61, fig. 20) met en évidence un décalage considérable de l'optimum de pH en présence d'un réducteur : le pH des deux sommets de la courbe d'activité en fonction du pH monte d'une demi-unité de pH en présence de sulfate ferreux qui abaisse le potentiel de 10 à 50 mV. Notons que pour la traduction des résultats en rH une augmentation de pH de 0,5 est balancée par un abaissement de potentiel de 29 mV ; il semble donc que, dans l'expérience citée, l'optimum d'action se trouve à rH fixe. En dépouillant la littérature, on trouve quelques indications portant à croire que l'influence du potentiel du milieu sur l'optimum de pH est un phénomène général. Ainsi Ganapathy et Sastri montrent que la papaïne

oxydée, c'est-à-dire privée des réducteurs habituellement introduits comme activateurs, a un optimum d'action à pH 3, alors qu'en présence de réducteurs les mêmes auteurs trouvent pH 4,5 à 5,0. Fruton et Bergmann étudient l'action d'un enzyme protéolytique extrait de la rate de Bœuf sur divers substrats synthétiques : dans deux cas et en présence de cystéine, l'optimum de pH est au-dessous de 5, dans un autre, en absence de réducteur, on trouve pH 5,5 ; cependant, le même substrat n'ayant pas été utilisé en présence et en absence de réducteur, il n'est pas certain qu'on puisse attribuer le décalage à une variation de potentiel. En tout état de cause, il faudrait représenter les résultats dans un système à trois dimensions : pH, potentiel et rendement, dans lequel nous trouverions une surface gauche. A défaut de données expérimentales permettant de définir cette surface, la représentation des résultats en fonctions du rH est certainement plus adéquate que celle en fonction du potentiel.

---

**Discussion de la signification biologique de nos résultats.**

Tous les enzymes protéolytiques intracellulaires que nous avons examinés s'étant montrés sensibles à l'influence du potentiel d'oxydation-réduction du milieu, nous pouvons nous demander jusqu'à quel point ce résultat peut s'étendre à d'autres enzymes. Nous avons vu qu'il n'en est rien pour la pepsine, ferment agissant normalement en dehors des cellules. Quelques essais que nous n'exposerons pas en détail ici, nous ont montré que l'amylase de la salive humaine, ainsi que l'invertine de la levure, sont également insensibles à l'action d'oxydants et de réducteurs. Des protéinases bactériennes se comporteraient de même (Maschmann). Par ailleurs, toute donnée précise manque. Nous pouvons cependant interpréter dans le sens d'une influence du potentiel, les expériences montrant l'activation d'enzymes par des réducteurs. Nous relevons l'uréase (Sumner et Poland et Tono, cependant contredits par Fischgold), l'amylase pancréatique et une amylase d'origine végétale (Pringsheim, Borchadt et Hupfer), l'arginase (Edlbacher et Leuthardt), la glyoxalase (Jowett et Quastel), l'apocymase (Wagner-Jauregg et Moller), certaines phosphatases (Roche, del Regno), la lipase du Ricin (Itoh), une déhydrogénase (Rapkine et Trpinac) et d'autres. Des toxines

d'origine microbienne sont également inhibées réversiblement par oxydation (Guillaumie, Fabre et Charles), de même une hémolysine pneumococcique (Shwachman, Hellerman et Cohen) et les bactériophages (Lominski). Les études que nous avons faites pour des systèmes protéolytiques devraient donc être étendues à d'autres systèmes.

Récemment, l'uréase a été étudiée de notre point de vue par Sizer et Tytell qui ont examiné l'activité de cet enzyme cristallisé entre +540 et −260 mV : les résultats se traduisent par une courbe en cloche avec un maximum à +150 mV ; l'uréase non purifiée ne s'est pas montrée sensible au potentiel du milieu de la même façon.

Pour nous rendre compte de la signification biologique de nos résultats, il faut d'abord situer les valeurs critiques de potentiel et de rH de nos systèmes fermentaires par rapport aux potentiels d'oxydation-réduction existant dans les cellules ou tissus dont ils proviennent. Le rH intérieur cellulaire est de l'ordre de 19 dans les cellules normales et peut descendre dans certaines conditions à 12 dans les mêmes cellules (Wurmser). Des mesures directes dans le foie (Kuehnau), dans la rate (Bierich et Lang), dans le muscle (Aubel et Mauriac, Uchimara), dans les tissus végétaux (Krassinsky) confirment suffisamment ces données pour les matériaux que nous avons utilisés. Les conditions de rH sont donc telles que les systèmes protéolytiques ne sont pas inhibés dans la cellule du fait du potentiel actuel.

On doit alors se demander pourquoi les ferments protéolytiques existant dans la cellule n'y entament pas l'intégrité des protéines constitutives du protoplasme. Une première série de faits que nous appellerons des facteurs structuraux peut rendre compte de cette inactivité. Il peut y avoir une séparation spatiale du ferment et de son substrat éventuel ou encore du ferment et de son activateur obligatoire ; le ferment peut être adsorbé sur un support non protéique ; il peut être fixé chimiquement sur un substrat inattaquable comme l'a vu Velluz pour les toxines tétanique et diphtérique qui se combinent avec la papaïne sans être digérées.

On peut, d'autre part, envisager des facteurs physico-chimiques : les conditions du milieu peuvent s'opposer à l'activité des ferments. Les données de la littérature montrent que le pH cytoplasmique peut ne pas être identique avec le pH correspondant à l'optimum de l'action du ferment. Il est cependant rare que le pH de l'intérieur cellulaire tombe tout-à-fait en dehors de la zone de pH permettant une activité de l'enzyme. Les données que nous venons d'apporter pour l'influence du potentiel d'oxydation-réduction sur l'activité des ferments mon-

trent que là encore l'optimum ne coïncide pas avec les caractéristiques de l'intérieur cellulaire à l'état normal, mais que celles-ci ne bloqueront en aucun cas toute l'activité du ferment. La massivité qu'on sait ne pas être indifférente pour les activités enzymatiques n'a cependant pas été suffisamment mise en jeu expérimentalement pour que nous puissions la faire intervenir dans nos discussions. Il se peut que les trois facteurs physico-chimiques se combinent (Vlès) et interviennent alors d'une façon différente, comme permet de l'entrevoir l'influence du potentiel d'oxydation-réduction sur l'optimum de pH que nous venons de signaler.

Il se peut, d'autre part, que les conditions d'une activité lytique réduite et par conséquent réglable par les caractéristiques physico-chimiques du milieu soient réalisées dans la cellule vivante, mais que cette activité soit compensée par une autre, synthétique, s'exerçant d'une façon analogue dans les mêmes conditions de milieu. Nous reviendrons sur ce problème.

Nous pouvons en tout cas envisager des phénomènes biologiques retentissant éventuellement sur l'activité des systèmes protéolytiques par les mécanismes que nous venons d'étudier. C'est dans ces raisonnements qu'apparaît l'intérêt de notre technique d'autolyse. Les enzymes agissant sur leur substrat naturel, nous réalisons *in vitro* le système lytique du tissu normal dans des conditions aussi voisines que possible de celles existant dans les cellules. Nous pourrons donc comparer nos résultats aux phénomènes de la vie cellulaire ce qui serait certainement moins correct pour des résultats obtenus avec des enzymes purifiés et des substrats étrangers (voir introduction).

On sait que les phénomènes de dégénérescence et de dénaturation protéique libèrent des groupements —SH. Ces mêmes groupements étant des activateurs des enzymes protéolytiques, on peut penser qu'une telle dénaturation intracellulaire, si elle existe, sera suivie de lyse plus ou moins localisée jusqu'à ce que l'élimination (par diffusion, par exemple) des produits réducteurs libérés rétablisse le potentiel normal.

Pour l'Arénicole dont nous avons étudié un système protéolytique, on a décrit une « histolyse saisonnière » (Bohn), c'est-à-dire une fonte des tissus en hiver quand l'animal reste enfoui dans le sable. Des mesures de potentiel effectuées dans la cavité cœlomique d'animaux normaux y décèlent un potentiel voisin de celui des témoins de nos digestions réalisés par simple broyage de tissus sans addition d'aucun réactif. Le potentiel mesuré, pouvant varier entre +50 mV et +300 mV, se place sur la pente de la courbe de l'activité de la protéolyse (voir fig. 15) et peut ne pas être très loin du potentiel

inhibant pratiquement celle-ci. Les conditions ainsi réalisées dans les tissus ne seraient donc pas favorables à une autolyse ; mais il suffit de réaliser une légère asphyxie de l'animal, par exemple en le couvrant d'une couche de sable, pour voir le potentiel dans la cavité coelomique descendre plus ou moins bas, quelquefois jusqu'à —50 mV. On obtient ainsi des conditions qui, d'après les expériences *in vitro*, doivent favoriser l'autolyse. Nous avons suggéré que la variation d'activité des ferments protéolytiques contenus dans la paroi de l'Arénicole avec les conditions de pH et d'oxydation-réduction du milieu que nous avons décelée peut intervenir dans la vie de l'animal. Des conditions de vie défectueuses et notamment une asphyxie partielle doivent activer la protéolyse.

Des variations fonctionnelles de l'activité des enzymes protéolytiques intracellulaires semblent fréquentes et si rien n'empêche de les attribuer dans notre sens à des variations de potentiel le manque de données expérimentales ne permet pas d'affirmer un tel mécanisme. Nous sommes cependant tenté d'envisager sous ce jour des observations comme celles de Simon qui voit l'autolyse des tissus du rein inhibée dans la néphrite par intoxication au chrome (agent oxydant), ou encore celles d'Orechowitsch qui compare l'action de la cystéine sur les tissus normaux et en régénération : l'action est nulle dans le second cas bien que l'activité soit plus forte que dans le premier ; nous pensons que les systèmes fermentaires dans le tissu en régénération sont déjà activés au maximum par les conditions physico-chimiques du milieu. Morse a étudié le conditionnement de l'atrophie de la queue du Têtard et a confirmé que l'occlusion des vaisseaux sanguins à la base de la queue (Bataillon) est le premier phénomène observable ; l'ischémie ainsi créée doit aboutir à un abaissement du rH tissulaire et favoriser ainsi l'autolyse. Nous citerons encore certains procédés de conservation de la viande qui utilisent des oxydants (nitrates par exemple) ; ceux-ci n'agiraient-ils pas en entravant la protéolyse ? On a interprété par une inhibition de la protéolyse l'action de certains oxydants introduits dans la farine comme améliorants de la panification (Joergensen).

Pour savoir si les phénomènes que nous avons étudiés dans des extraits de graines d'Orge interviennent dans la mobilisation de l'azote au moment de la germination, nous avons fait des mesures de potentiel d'une électrode de platine dans la graine. Nous avons exploré systématiquement différents points de graines soumises à une imbibition de 18 heures à température ordinaire. La topographie des potentiels est assez constante. Le potentiel le plus élevé se trouve au centre de la graine : + 370 mV en moyenne. Vers les deux pôles les valeurs moyen-

nes sont plus basses (+ 325 mV). Le potentiel nettement le plus bas se trouve toujours au contact de la base de la jeune racine (+ 215 mV). Ces valeurs ne montrent pas d'évolution importante entre la première et la cinquième journée de la germination. Au bout de 5 jours, l'électrode introduite dans le parenchyme des jeunes feuilles (en lumière diffuse) prend des potentiels bas (+ 190 mV) alors que les tissus des racines se fixent aux environs de +365 mV. Une différence de potentiel entre les racines et le sommet d'une même plante avait déjà été vue par d'autres auteurs. Toutes ces valeurs de potentiel sont très élevées par rapport à l'optimum de l'activité hydrolytique des protéinases de la graine. D'après les courbes d'activité que nous avons données celle-ci serait réduite de moitié environ aux potentiels mesurés dans la graine. Janicki a montré que le potentiel d'oxydation-réduction diminue dans la graine au cours de la germination, résultat que nous n'avons pas confirmé entre le premier et le cinquième jour, mais qui rendrait bien compte de la mobilisation de l'azote par accentuation de l'activité lytique des enzymes protéolytiques. D'autre part, il est peut-être intéressant de rappeler que la papaïne a un domaine d'activité condensatrice dans les potentiels élevés (+ 450 à + 570 mV à pH 6,5) au-dessus de la zone de potentiel compatible avec son fonctionnement hydrolytique (voir plus loin l'exposé de nos expériences). Si l'extrait d'Orge se comportait de la même façon on aurait dans la graine un équilibre entre les phénomènes de lyse et de synthèse dirigé par le potentiel actuel. Nous reviendrons plus loin sur cet important problème.

Nous avons pensé pouvoir analyser la signification des potentiels mesurés en modifiant l'activité physiologique de la plantule. Pour le moment nous avons étudié l'influence du froid et des vapeurs de toluène. Le froid (séjour de 2 heures à — 3° environ) modifie très peu les potentiels ; à peine sont-ils légèrement diminués. D'après Butkewitsch les vapeurs de de toluène diminuent les processus de synthèse sans entraver l'hydrolyse protéique ; dès le premier quart d'heure de séjour dans les vapeurs de toluène tous les potentiels de la graine baissent considérablement pour atteindre après une heure environ des valeurs minimales situées de 50 à 80 mV au-dessous des valeurs normales ; les écarts relatifs entre les divers points de la graine subsistent. Ensuite les potentiels montent ; au cours de 24 heures, pendant que la plantule meurt, les valeurs se rapprochent d'un niveau commun vers +350 mV. La chute initiale de potentiel dans les vapeurs de toluène en rapprochant les potentiels de l'optimum de la protéolyse semble corroborer les conclusions de Butkewitsch.

# ESSAIS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE IN VITRO

## Historique.

### Faits expérimentaux.

L'explorateur de la littérature enzymologique — et spécialement quand il s'agit de substrats protidiques — est amené à faire une constatation curieuse : à l'énorme masse des données sur l'hydrolyse des matières azotées par des enzymes variés ne fait face qu'une documentation extrêmement fragmentaire sur les possibilités de synthèse. Et pourtant si l'organisme vivant réalise l'hydrolyse des matières azotées alimentaires c'est le plus souvent un processus se passant dans le milieu extérieur et qui ne saurait être considéré comme une manifestation intégrante de la matière vivante. La synthèse, par contre, de cette matière même, à partir de constituants élémentaires pris dans le milieu, et tous les remaniements fonctionnels de l'intérieur de la cellule exigent l'intervention de catalyseurs dont le rôle s'oppose en quelque sorte aux ferments digestifs et qui, eux, nous semblent l'apanage exclusif de la matière vivante au moins quant à leur origine. Pour le biologiste, ces phénomènes de condensation et de synthèse paraissent autrement importants que les processus de digestion alimentaire. Mais si ceux-ci frappent l'observateur le plus superficiel et, dirons-nous, le moins philosophique, et lui offrent des matériaux d'étude bien accessibles par la spécialisation des appareils digestifs chez les animaux quelque peu évolués, les processus de synthèse, en raison même de leur ubiquité dans la matière vivante, ne disposent ni d'appareil différencié ni même de localisation bien précise. Ils n'attirent pas l'attention du chercheur. C'est dans ce sens que Maurice Nicolle pouvait dire que dans l'organisme tous les processus de construction sont silencieux.

La relative indifférence du chercheur vis-à-vis du processus de construction organique intracellulaire a même abouti à ce paradoxe que les enzymes extraits de tissus ou de cellules n'ont été le plus souvent éprouvés que quant à leurs capacités de lyse alors qu'un raisonnement bien simple devait les faire considérer (au moins en tant qu'hypothèse de travail) comme les agents des constructions dont les cellules sont le lieu.

Il est, en effet, probable (la preuve est faite sans discussion possible pour certains enzymes s'adressant à des substrats autres que les protides) que les mêmes enzymes réalisent suivant les conditions du milieu l'hydrolyse ou la condensation. Ayant exploré et démontré l'action du potentiel d'oxydation-réduction du milieu sur l'activité lytique de protéinases, nous devions faire le pendant de cette investigation pour les activités synthétisantes. Mais, tandis que l'activité lytique est bien étudiée pour un grand nombre d'enzymes extraits de tissus vivants et nous offre par conséquent un point de départ solide, les condensations protidiques *in vitro* sont encore contestées. Non pas qu'on puisse, à notre avis, nier théoriquement leur existence dans la cellule vivante, mais leur reproduction possible *in vitro* par des enzymes extraits est discutée. Nous allons donc d'abord faire un rapide exposé des essais de synthèse enzymatique *in vitro* de protides plus ou moins complexes à partir d'éléments plus simples (1).

Un grand nombre de tentatives, et historiquement les premières, ont porté sur une action condensante éventuelle du suc gastrique. Etant donné qu'il s'agit là de ferments digestifs qui n'ont peut-être aucune fonction intracellulaire, on ne saurait faire à priori l'hypothèse d'une activité synthétisante à moins d'admettre la réversibilité de tous les processus enzymatiques. Déjà, en 1894, Danilewski a fait l'observation, confirmée par Okunew en 1907, que la présure détermine dans une solution de peptone un coagulum qui présente le caractère d'une globuline ; il s'agirait donc d'une synthèse. D'autres chercheurs de l'école russe (Lawrow, Sawjalow, Kurajew notamment) étudient ce phénomène et montrent finalement qu'il peut être obtenu également avec d'autres ferments protéolytiques et Nuebenberg le reproduit avec des extraits d'organes. On appelle coagulose la substance condensée précipitée en présence de papaïne et plastéines celles obtenues par des enzymes d'origine animale. Voici comment se réalise l'expérience fondamentale de Danilewski : 10 $cm^3$ d'une solution de pep-

(1) Nous n'envisageons pas ici les synthèses de polypeptides qui ont été réalisées, par Fischer par exemple, par des mécanismes chimiques qui ne sauraient se produire dans la cellule vivante (voir aussi Borsook).

tones à 40% sont additionnés de 0,7% de ClH et de 0,12 g. de pepsine ; le tout porté à 65° se transforme peu à peu en une gelée qu'on dilue à l'eau et qu'on filtre. Sur le filtre reste un précipité insoluble qui représente jusqu'à 10% des peptones employées : la plastéine. La vitesse de gélification augmente rapidement avec la température : il faut 5 jours à 5°, 26 heures à 40°, 35 minutes à 60° et 20 minutes à 70°, mais, la destruction de la pepsine s'accélérant également à température croissante, le maximum de précipité est obtenu entre 37 et 40°. Une réaction légèrement acide (au-dessus du virage du papier Congo, c'est-à-dire pH $\geqslant$ 4) est favorable (Lawrow), on reste loin de l'acidité nécessaire pour la digestion pepsique, acidité qui inhibe toute production de plastéine. Nous trouvons donc là l'indication d'un enzyme fonctionnant dans un sens ou dans l'autre suivant les propriétés physico-chimiques du milieu.

En 1904, Bayliss note que l'action de la trypsine aboutit à une diminution de la conductivité électrique d'une solution concentrée de produits de digestion trypsique : il interprète cette diminution des ions libres comme étant due à une disparition de groupements ionisables, à une condensation. En 1907, Robertson obtient par action de la pepsine et Taylor par action de la trypsine sur des produits de digestion de la caséine une substance assez mal caractérisée, la paranucléine, qui serait le résultat d'une synthèse.

La production de plastéine semble bien être due à une activité enzymatique : une anti-protéinase, l'anti-trypsine du sérum, empêche également la formation de plastéine (Jacoby). Seuls les produits d'une hydrolyse pepsique ou chimique peuvent être utilisés ; les produits d'une hydrolyse trypsique ne fournissent pas de plastéine (Henriquez et Gjaldbaek). La plastéine ne semble pas résulter d'une insolubilisation de peptones ; sa composition en acides aminés est, d'après Levene et Van Slyke, assez différente de celle des peptones de Witte ayant servi de matériel de départ ; elle est plus pauvre en glycocolle et alanine, plus riche en acide glutamique, acide aspartique, etc... Henriquez et Gjaldbaek montrent qu'il s'agit bien d'un processus de condensation : dans une solution d'ovalbumine de 30 % fortement peptonisée, la pepsine agissant à 37° pendant 11 jours fait baisser l'azote formoltitrable de 42,3 à 38,3 p. cent de N total pendant qu'apparaît un précipité abondant. Quand on sépare le précipité formé, son azote formoltitrable ne représente que 13,4 p. cent de son azote total, ce qui traduit une disparition considérable de groupements aminés libres par condensation par rapport au filtrat dans lequel l'azote formoltitrable représente 39,5 p. cent. La dimi-

nution de l'azote formoltitrable avait déjà été vue antérieurement par Glagolew, elle sera encore confirmée, en même temps que la disparition de groupements carboxylés libres, par Collier. Parallèlement, les réactifs précipitant les protéines (tanin et autres) donnent un précipité progressivement plus abondant au cours de la condensation. D'après les expériences de Herrmann et Chain une plastéine de peptone de fibrine inoculée au Lapin aboutit à un antisérum actif vis-à-vis de différentes plastéines, mais inactif sur la peptone de départ ainsi que sur d'autres matières albuminoïdes naturelles. La plastéine semble donc bien être une substance définie.

Les modalités de production de la plastéine ont été étudiées de plus près par Borsook, Mc Fadyen et Wasteneys : ils utilisent les produits de digestion pepsique amenés à pH 4 ou des peptones. La synthèse leur paraît indiscutable et d'un rendement d'autant plus fort que la dégradation préalable avait été poussée moins loin. Malgré ces recherches nombreuses apportant des précisions fort poussées sur la production des plastéines, leur caractère de produit de synthèse est mis en doute principalement par Bayer qui les considère dès 1903 comme polypeptides à propriétés modifiées mais pas nécessairement condensés, et surtout en 1940 par Linderstroem-Lang qui est frappé par le poids moléculaire bas des précipités recueillis (environ 1200 d'après Folley) et par la nécessité d'une nouvelle addition de pepsine après le premier temps de digestion : Linderstroem-Lang se demande s'il ne s'agit pas d'un produit de combinaison de la pepsine ou de ses impuretés avec des produits de digestion. Nous verrons plus loin que cette hypothèse ne saurait s'appliquer à d'autres condensations observées ; mais elle paraît être une sérieuse critique pour des expériences telles que celles de Robertson et Brailsford ou certains essais de Borsook et Wasteneys qui concentrent au bain-marie le produit de digestion pepsique avant d'ajouter une nouvelle quantité de pepsine. Cette concentration préalable peut modifier complètement les conditions de solubilité de certains complexes d'origine physico-chimique pure (Vlès) et un précipité éventuel ne saurait plus être attribué à coup sûr aux actions enzymatiques. Rona et Chrometzka, opérant également sur des produits de digestion pepsique concentrés après la digestion en vue de l'essai de synthèse, observent l'augmentation du précipité par l'acide trichloracétique et la diminution de l'azote aminé, mais pas de variation des groupements carboxyles libres ; ils se demandent s'il ne s'agit pas d'une désamination.

Signalons encore que certains auteurs ont étendu le terme

de plastéine à des produits de condensation par des mécanismes autres que l'action de la pepsine. Nous sommes ainsi conduits à relever dans la littérature et à discuter un ensemble de faits très variés pouvant être considérés comme des condensations protidiques par action d'enzymes spécifiques.

Nous passerons d'abord en revue les tentatives faites avec des enzymes d'origine végétale. Zaleski constate que dans des petits Pois non murs sortis de la cosse, l'azote protéique augmente aux dépens de l'asparagine. Cette constatation l'amène à faire l'expérience suivante : des petits Pois non murs sont broyés au sable et portés dans une solution d'asparagine à 0,75% en présence de toluène ; des dosages effectués à des intervalles réguliers montrent que pendant 21 jours l'azote protéique diminue pour augmenter ensuite, il y aurait donc resynthèse partielle. D'autre part, il utilise un extrait de petits Pois qu'il fait agir sur la peptone de Witte : il conclut à une condensation lente mais nette.

L'école russe a étendu ses expériences à d'autres enzymes que la pepsine. Kurajew a fait agir la papaïne sur le produit de digestion de la fibrine après concentration par évaporation ; il observe la formation de corps analogues aux plastéines et qu'il appelle coaguloses. Iwanoff fait agir un ferment protéolytique de levure en milieu alcalin sur des peptides : l'azote précipitable à l'acétate de plomb augmente aux dépens de celui des peptides qui ne précipite pas ; ceux-ci se sont donc condensés en molécules plus grosses. Enfin Blagowestschenski expose en 1926 l'action synthétisante des protéinases végétales.

Plus récemment, Voegtlin, Maver et Johnson obtiennent une resynthèse partielle par passage d'oxygène dans le produit de digestion de la fibrine par la papaïne activée. Bersin et Koester observent une inversion de l'action hydrolytique de la papaïne en la faisant agir sur les hydrolysats au contact de l'air et en présence d'ascorbinate de Cu. C'est au moyen de la papaïne que nous avons pu mettre en évidence une condensation de produits de digestion et signaler en 1936 les conditions d'oxydation-réduction du milieu permettant à ce processus de se faire. Cependant, Strain et Linderstroem-Lang reprennent des essais de synthèse de protéides par aération de produits de digestion, mais avec des résultats négatifs. En partant de produits de l'hydrolyse de différents substrats par la papaïne une aération intense amène bien une augmentation du précipité trichloracétique, mais le dosage des groupements aminés et carboxylés libres n'accuse aucune diminution. Il s'agirait plutôt d'une formation de ponts -S-S- entre des chaînes de peptides par oxydation des groupements -SH.

Il faut en plus considérer les critiques que Linderstroem-Lang adresse à l'interprétation des résultats expérimentaux.. La principale a trait à la possibilité de réactions autres que la condensation peptidique et qui aboutiraient également à une disparition de groupements aminés libres. Ainsi -$NH^2$ peut réagir avec les aldéhydes et spécialement avec le glyoxal. La technique de van Slyke comporterait des possibilités d'erreur qui n'existent pas avec d'autres procédés de dosage. Les molécules ainsi formées atteindraient éventuellement la limite de précipitabilité par l'acide trichloracétique (1). De même, Strain et Linderstroem-Lang ont des résultats négatifs en partant de l'autolyse de levure. Enfin des transmutations dans les chaînes peptidiques pourraient créer des peptides plus volumineux et insolubles (2). Mais les dosages de -$NH^2$ et -$CO^2H$ n'accuseraient dans ce sens aucune variation.

Parallèlement à ce qu'on avait fait pour l'hydrolyse, Collier recherche en 1940 pour la condensation par la papaïne les conditions d'activation et d'inhibition. La papaïne activée par CNH, la cystéine ou $SH^2$ produit une plastéine à partir des produits de digestion papaïnique ou pepsique d'ovalbumine. L'optimum est à pH 4,8. L'ébullition, la présence d'iodacétate ou d'oxydants tels que $H^2O^2$, l'alloxane ou simplement une large aération inhibent le processus. La plastéine formée peut être hydrolysée à son tour par la papaïne (optimum de pH : 4,2) qui libère les groupements aminés et carboxylés comme on le sait pour l'hydrolyse de protéines naturelles. L'auteur conclut que les conditions de pH et d'oxydation-réduction sont approximativement les mêmes pour l'hydrolyse et la synthèse qui coexisteraient dans le même milieu et aboutiraient à un équilibre de sorte que seules les concentrations des termes de la réaction détermineraient le sens de l'action enzymatique. Cette conclusion est, pour les enzymes protéolytiques, en contradiction avec d'autres faits expérimentaux et ne s'applique d'ailleurs pas aux expériences du même auteur avec la pepsine cristallisée : celle-ci exige des conditions physico-chimiques particulières pour la production de plastéines. Nous exposerons plus

(1) On peut se demander si une telle réaction ne pourrait pas être considérée comme une condensation au même titre que la production de liaisons peptidiques, bien que son importance quantitative doive forcément rester limitée.

(2) Même réflexion que dans la note précédente : là encore nous nous demandons si un tel processus ne pourrait pas être considéré comme un des mécanismes aboutissant à la production de grosses molécules.

Pour ce qui est des critiques d'ordre technique, nous pensons qu'elles ne sauraient intervenir dans l'interprétation des expériences personnelles que nous allons exposer.

loin les expériences qui ont conduit à la synthèse de peptides par action de la papaïne sur des mélanges d'acides aminés et de corps simples divers n'existant pas dans l'organisme.

Les observations de synthèses avec des enzymes d'origine animale et intracellulaire sont nombreuses, mais souvent bien fragmentaires. Après les recherches sur les plastéines que nous avons signalées, DE BRUYNE étudie en 1924 l'azote précipitable par la chaleur dans les autolysats de foie ; cette forme d'azote peut augmenter, témoignage de phénomènes de synthèse, si la réaction du milieu est faiblement alcaline. HAARMANN confirme cette possibilité de synthèse dans les autolysats de foie et de rein faiblement alcalinisés en étudiant les complexes et précipités cuivriques. Ayant étudié la biochimie de la métamorphose des Lépidoptères et ayant suivi les remaniements importants des matières azotées, Mme COURTOIS-DRILHON pense disposer chez les larves de Lépidoptères de systèmes enzymatiques puissants ; elle fait agir pendant 4 à 12 jours à 38° du sang de larve en crise histogénétique sur de l'hydrolysat de chair de poisson exempt de substances précipitables par l'acide trichloracétique : effectivement, les acides aminés disparaissent du mélange sans qu'il y ait formation d'ammoniaque.

Dans les recherches de VOEGTLIN, MAVER et JOHNSON apparaît un essai de modifier les conditions de milieu en vue de favoriser la synthèse : le passage d'oxygène dans les autolysats de tissus donne des résultats positifs à ces auteurs : l'azote coagulable augmente. RONDONI et POZZI observent avec un matériel semblable une augmentation des fractions précipitables par l'acide trichloracétique après introduction d'eau oxygénée dans l'autolysat. MYSTKOWSKI étudie la catepsine de l'embryon de Poulet ; il dit avoir échoué dans ses essais de synthèse. Nous relevons cependant dans son mémoire une expérience ayant abouti à une condensation probable : de la gélatine ou de l'ovalbumine est digérée à pH 4,7 par un extrait du jaune d'œufs en incubation ; après 4 à 5 jours, on concentre, on amène à un pH compris entre 6 et 7,2, on réajoute de l'extrait frais et éventuellement du glycogène, $H^2O^2$ ou $SO^4Cu$ et, dans un certain nombre de lots, on assiste à une diminution de l'azote aminé libre. Dans une recherche de MAVER, nous notons également la réalisation d'une synthèse qui, cependant, n'a pas été relevée par l'auteur : il s'agit de l'action d'une catepsine purifiée sur la globuline du foie de Rat. On mesure pour différents pH les variations de l'azote protéique. Entre pH 3 et 6, il y a digestion avec un optimum à pH 4 ; mais à pH 8, on note une augmentation de l'azote précipitable, augmentation équivalente à un cinquième de la digestion à pH 4.

La disparition de l'azote aminé dans des extraits de foie est étudiée de plus près par Agren et Hammarsten. Dans des extraits soigneusement déprotéinés amenés à pH 6,7 et additionnés de tricrésol apparaît lentement (en 3 à 60 jours) une fraction précipitable par l'acide sulfosalicylique ou trichloracétique. En même temps, l'azote aminé libre diminue de 7 p. cent. Le corps précipitable a un point isoélectrique entre pH 5 et 7 et peut être hydrolysé par des polypeptidases.

Dans d'autres recherches, les auteurs ont fait agir des enzymes soit sur des acides aminés purs tels qu'ils existent dans les organismes, soit sur des corps chimiques présentant des fonctions acides et aminées se prêtant éventuellement à une condensation. On peut dans ces conditions opérer avec des enzymes purifiés agissant sur des substrats rigoureusement connus. Dans une expérience inédite datant de 1920, Vlès fait agir un extrait glycériné d'intestin de Sélaciens sur du glycocolle ; il pratique la réaction du biuret et l'analyse spectrophotométrique de la couleur développée permet de déceler une réaction du biuret positive à côté du spectre du glycinate de Cu. Blagowestschenski (1926) fait agir une protéinase de *Phaseolus Mungo* sur une solution de leucine et de glycine en présence de glycérol : des polypeptides se forment.

Bergmann et Fraenkel-Conrat font agir de la papaïne sur un mélange de carbobenzoxyglycine et d'aniline, il se forme un anilide peu soluble qui cristallise. Le rendement peut atteindre 80 p. cent en quelques jours. On obtient de même un anilide de benzoyl-*l*-leucine. La papaïne doit être activée par la cystéine, le glutathion ou CNH ; l'optimum de pH est 4,6 ; la papaïne opère donc cette synthèse dans les mêmes conditions physico-chimiques que les hydrolyses. Mais ces mêmes conditions ne permettent pas de synthèse avec des acides aminés non substitués. Il s'agit donc d'un cas particulier ; néanmoins il démontre sans discussion possible la catalyse d'une condensation de type peptidique par une protéinase. Les auteurs ont également utilisé la broméline et la catepsine du foie ; les mêmes réactions se produisent, mais avec un rendement moindre. En étendant ces recherches Bergmann et Fruton montrent que la chymotrypsine catalyse la synthèse de la benzoyl-*l*-tyrosylglycine à partir de benzoyl-*l*-tyrosine et de glycylanilide. Bergmann et Behrens font agir la papaïne sur un mélange d'aniline et d'acétyl-*d*-*l*-phénylalanylglycine : ce n'est que l'anilide gauche qui se forme. La synthèse enzymatique est donc asymétrique comme dans l'organisme.

Borsook et Dubnoff étudient la synthèse de l'acide hippurique. Les données thermochimiques montrent que l'équilibre entre les produits d'hydrolyse d'une part et l'acide hippurique

d'autre part se trouve réalisé, en absence d'enzymes, par une hydrolyse presque complète dans les conditions de concentration (0,1 m) et de température (25°) choisies par les auteurs. La synthèse absorbe de l'énergie qui doit éventuellement être fournie par une réaction couplée. En présence de tranches de rein ou de foie la synthèse atteint un taux élevé (jusqu'à 76% de l'acide benzoïque fourni), variable d'ailleurs suivant les tissus utilisés et les espèces animales sur lesquels ils ont été prélevés. Les synthèses ainsi obtenues en présence de protéinases peuvent éventuellement être réalisées sans leur intervention, mais alors dans des conditions qui semblent être très différentes de celles réalisées dans une cellule vivante. Nous rappelons à ce sujet que Henniger en 1878, Hofmeister en 1878 et plus tard Schuetzenberger ont réussi à condenser des peptones en corps plus complexes par l'intervention d'agents déshydratants et de températures élevées. La condensation en milieu glycériné est spécialement étudiée par Balbiano et Trasciatti et par Maillard. A la surface de solutions de peptones les rayons ultraviolets produisent une membrane de constitution analogue à celle des plastéines (Lieben et Jesserer).

---

**Influence de l'équilibre d'oxydation-réduction du milieu.**

Dans un grand nombre de techniques fermentaires l'adjonction d'oxydants et de réducteurs joue un rôle important. Les lyses exigent souvent la réalisation d'un milieu réducteur et dans la première partie de notre exposé nous avons pu préciser les conditions de potentiel dans ce sens. D'autre part, dans les essais de synthèse que nous venons de résumer, l'aération des milieux et éventuellement l'addition d'oxydants sont presque toujours considérées par les auteurs comme moyens de favoriser la condensation. Cette action directrice de l'équilibre d'oxydation-réduction du milieu, c'est-à-dire l'orientation de l'activité enzymatique vers l'hydrolyse en milieu réducteur, vers la synthèse en milieu oxydant, semble avoir été entrevue pour la première fois par Waldschmidt-Leitz et Purr en 1931 ; ces auteurs disent : « Eher scheint uns die Vorstellung einer Steuerung des intrazellularen Eiweissumsatzes durch das Oxydo-Reduktionspotential im Sinne der Hydrolyse einerseits,

der Synthese andererseits physiologischen Sinn zu besitzen » (1). Dans le même ordre d'idées ces auteurs envisagent avec Weil l'influence du sulfhydryl sur les échanges intracellulaires des protides et des glucides. En étudiant la signification biologique des potentiels d'oxydation-réduction Wurmser admet également que les réactions enzymatiques dans la cellule vivante et notamment l'équilibre entre les synthèses et les lyses sont sous le contrôle de ces potentiels. Mothes a apporté des arguments expérimentaux que nous avons exposés dans l'introduction en faveur de cette conception.

L'idée générale de l'orientation d'une même réaction d'équilibre vers la lyse, d'une part, vers la condensation, d'autre part, suivant les conditions ambiantes est plus ancienne. Elle a été nettement formulée par Maurice Nicolle en 1908. En élaborant une conception générale des anticorps cet auteur considère l'hypersensibilité, phénomène bruyant, comme traduisant une hétérolyse et l'immunité, phénomène silencieux, une hétérocoagulation (2). « La substance vivante, préalablement impressionnée par les antigènes, réagit donc vis-à-vis d'eux, tantôt d'un sens, tantôt de l'autre, comme on vient de voir qu'elle le fait pour ses propres éléments ; tout dépend des circonstances en jeu, plus précisément, du « signe » de leur résultante ».

---

(1) Traduction : L'idée d'une orientation du métabolisme intracellulaire des protides par le potentiel d'oxydation-réduction, dans le sens d'une hydrolyse d'une part, de la synthèse d'autre part, nous semble plutôt avoir une signification physiologique.

(2) Nous appellerions aujourd'hui condensation ce que M. Nicolle désigne ici par le terme de coagulation.

## Expériences personnelles

### Technique générale.

Les auteurs qui ont essayé d'obtenir une synthèse protéique *in vitro* ont procédé le plus souvent par concentration des produits d'une hydrolyse préalable en pensant déplacer ainsi vers une condensation l'équilibre basé sur la loi des masses. Des objections ont été faites contre les résultats obtenus de cette façon : les milieux réalisés par la protéolyse initiale sont trop complexes pour qu'on n'ait pas à craindre des causes d'erreur. Au cours de la concentration de nouveaux complexes pourraient se former ou certains constituants atteindraient la limite de solubilité, bref des modifications des équilibres physico-chimiques pourraient être prises pour des actions enzymatiques.

Nous avons donc utilisé pour nos essais de condensation les milieux tels qu'ils résultaient de l'hydrolyse préalable sans les concentrer ni chercher à isoler des fractions, ni introduire des ferments purs. Après avoir laissé évoluer un système assez loin dans le sens de la lyse nous modifions les conditons physico-chimiques dans l'intention de déterminer un renversement du sens de l'action enzymatique. Les recherches exposées dans la première partie de notre travail ayant montré qu'un milieu faiblement réducteur accentue l'activité lytique, de nombreuses expériences que nous venons de rappeler ayant mis en évidence l'action favorisante des milieux oxydants pour les condensations, nous avons été amené à mettre en œuvre une augmentation du potentiel d'oxydation-réduction du milieu pour essayer d'obtenir les résultats cherchés. Dans certains cas et en nous basant sur des indications de la littérature nous avons modifié en même temps le pH. Etant donné aussi que les pH optima pour la lyse sont généralement inférieurs au pH intérieur des cellules ou tissus d'origine des enzymes et que nous voulions reproduire *in vitro* l'activité synthétisante de ces tissus nous avons généralement élevé le pH du milieu après

la lyse dans l'intention de nous rapprocher des conditions existant *in vivo*. Dans le même souci nous n'avons pas opéré sur des substrats purs, mais sur des produits complexes d'une autolyse, pensant respecter ainsi des spécificités éventuelles des enzymes et l'activation possible par des corps existant dans le milieu. En plus il se pourrait que des réactions secondaires se passant dans le milieu complexe soient utiles pour l'accomplissement des condensations protidiques (constitution de réactions couplées, sources d'énergie, etc... . Un exemple d'une telle intervention est donné dans une recherche de Kostytchew : cet auteur reprend les expériences d'Iwanoff sur la synthèse qui peut se produire dans un autolysat de levure et il montre que la présence de glucides est indispensable pour que le résultat soit obtenu. Une dérogation à notre technique a été faite pour la papaïne et la pepsine pour lesquels la gélatine et quelquefois la caséine ont fourni le substrat.

Voici la technique globale résultant de ces considérations : dans un premier temps on opère une lyse avec la technique fixée au début de ce travail. Le même matériel de départ a servi le plus souvent aux expériences de lyse et de condensation. La lyse est poussée plus loin que dans les expériences que nous avons rapportées ; elle n'est cependant pas complète, surtout parce que généralement nous n'avons pas ajouté de réducteurs. Le milieu ainsi obtenu est amené à un pH différent et réparti en lots. Les uns restent à la glacière avec ou sans addition de réactifs, les autres sont placés à l'étuve après différentes additions. Les potentiels sont mesurés après 1-2 jours d'étuve et différents dosages sont opérés.

---

### Expériences avec la papaïne.

Nous avons examiné l'action de la papaïne sur le produit d'hydrolyse de la gélatine, cette hydrolyse étant effectuée par la papaïne même. La digestion de la gélatine se fait à 37° pendant 24 heures en présence d'un tampon de citrate ou de phosphate m 10, de papaïne brute activée, de toluène et, pour certaines séries, d'un tiers du volume de glycérine. L'hydrolyse, dans ces conditions, est très avancée sans être complète. Dans différents échantillons de ce mélange, on introduit divers oxydants en proportion va-

riable. Comme tels, nous avons utilisé l'eau oxygénée, le ferricyanure, l'iodate, le bichromate et le persulfate de K et le perborate de Na. Les échantillons sont encore portés à 37° et le potentiel d'une électrode de platine plongeant dans les mélanges est mesuré à intervalles réguliers ; pour la plupart des oxydants, un plateau s'installe, ce qui permet de réduire le nombre des mesures de potentiel pour un échantillon et de rapporter le résultat du dosage au potentiel final. On dose l'azote formoltitrable de la gélatine avant et après digestion, celui du lysat immédiatement après introduction des oxydants

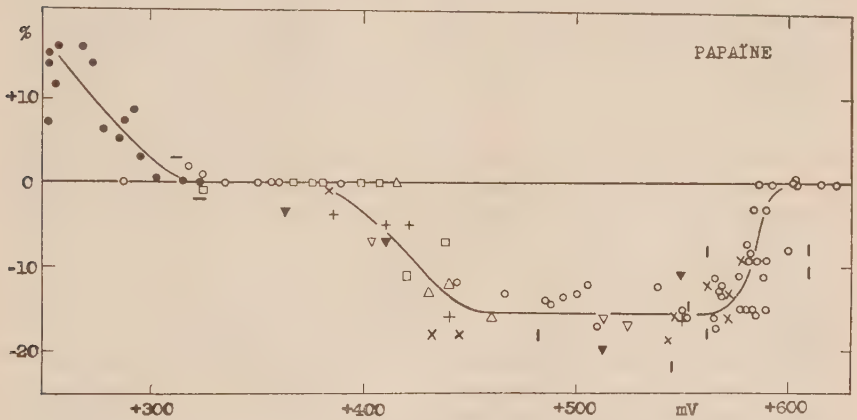


Fig. 33. — Variation, en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu, de l'azote formoltitrable exprimé en p. cent de l'azote libéré par digestion préalable de gélatine par la papaïne à pH 6,5.

Lots réalisés en présence de glycérine par addition d'eau oxygénée (o), de ferricyanure de K (■), d'iodate (+), de perborate (Δ), de bichromate (▽), de persulfate + bichromate (×) ; lots sans addition d'oxydant (.).

Lots réalisés en absence de glycérine avec addition d'eau oxygénée (|), de bichromate (▼), sans addition (—).

et après 21 heures d'action des oxydants à 37° ; on conserve également dans l'étuve des lots sans addition d'oxydants. Dans certains échantillons additionnés d'oxydants, on observe une diminution de l'azote formoltitrable traduisant une condensation des groupements aminés. Nous rapportons cette condensation (différence de l'azote formoltitrable avant et après action des oxydants) à l'hydrolyse obtenue dans le premier temps de l'expérience (différence avant et après digestion).

Dans un graphique (fig. 33), nous résumons les résultats de deux séries d'expériences effectuées l'une en présence, l'autre en absence de glycérine, sur de la gélatine à 20% à pH 6,5

tampon citrate). En accord avec les expériences rapportées précédemment, la digestion continue dans les lots qui, placés à l'étuve sans addition d'oxydants, ont des potentiels de platine rapportés à l'électrode à $H^2$ inférieurs à +300 mV environ ; elle se traduit par des augmentations de l'azote formoltitrable atteignant 15% de l'azote qui avait été libéré par la digestion préalable. Pour de faibles additions d'oxydants portant le potentiel jusqu'aux environs de +400 mV, la formoltitration n'accuse aucune variation : la protéolyse est arrêtée. Dans les lots amenés au-dessus de +410 mV, l'azote formoltitrable diminue, quel que soit l'oxydant utilisé. La condensation augmente entre +410 et +450 mV et reste approximativement constante jusqu'à +570 mV. Ce plateau correspond à une condensation de 15% des groupements aminés libérés par la digestion préalable. Au-delà de +570 mV, l'effet diminue sans que nous puissions affirmer qu'il ne s'agit pas d'une action spécifique de $H^2O^2$, seul oxydant qui nous a permis d'atteindre ces potentiels sans que les quantités utilisées risquent de détruire les constituants des systèmes mis en œuvre.

Dans d'autres expériences dans lesquelles les proportions des matériaux de départ étaient différentes, le rendement de la condensation atteint des valeurs plus élevées. En partant de gélatine à 10 p. cent additionnée de tampon au citrate à pH 6, de 0,8 p. cent de papaïne et de ferrocyanure un séjour de 72 heures à l'étuve à un potentiel de +291 mV porte l'azote formoltitrable de 6,2 à 8,0 (en $cm^3$ NaOH n/25 par $cm^3$ de milieu). On ajoute ensuite 8 gouttes de $H^2O^2$ pour 100 $cm^3$, ce qui fait monter le potentiel progressivement à +560 mV et, après 48 heures d'étuve, l'azote aminé retombe à 6,3 (condensation de 94% de l'azote aminé libéré dans le premier temps). Dans une expérience analogue, l'hydrolyse porte cet azote de 6,4 à 9,1 et l'addition d'oxydants le fait revenir à 7.1 (condensation de 74%).

Nous avons fait un certain nombre d'expériences destinées à vérifier que des causes d'erreur éventuelles ne viennent pas annuler ou diminuer les conclusions à tirer de ces expériences. Nous avons d'abord établi que la papaïne purifiée d'après Willstaetter et Grassmann donne les mêmes résultats.

Le gros écueil de dosages au formol est l'existence éventuelle de processus de désamination avec production d'ammoniaque. Nous avons dosé l'ammoniaque par addition de borate de Na ou de lithine et entraînement à la vapeur d'eau dans l'appareil de Parnas et Wagner. Voici un exemple des résultats obtenus :

Expérience 154. — Digestion de gélatine à 5% dans un tampon

au citrate à pH 6 par 0,2 g. de papaïne p. cent en présence de ferrocyanure pendant 48 heures (= 1er temps). Ensuite, préparation de lots variés, placés encore 48 heures à l'étuve (= 2e temps).

| | Potentiel final en mV | N formoltitrable en NaOH n/25 pour 3 cm³ | NH³ en NaOH n/25 pour 3 cm³ |
|---|---|---|---|
| Témoin glacière initial. . | | 1,5 | 0,7 |
| A la fin de la digestion (1er temps). . . . . | | 3,5 | 0,7 |
| A la fin de l'expérience (2e temps) : | | | |
| Etuve sans addition. . . . | + 322 | 3,6 | 0,8 |
| + $H^2O^2$ (1 goutte sur 30 cm³). . . . . | + 568 | 3,1 | 0,5 |
| Idem (3 gouttes). . . . . | + 581 | 3,0 | 0,7 |
| Idem (8 gouttes). . . . . | | 3,2 | 0,9 |

Cette expérience montre donc — et d'autres que nous citons plus loin confirmeront — que l'ammoniaque ne varie pratiquement pas (0,7) avec des doses de $H^2O^2$ qui réalisent la condensation de 3,5 à 3,0 d'azote formoltitrable à la limite supérieure de potentiel permettant cette condensation. Ce ne sont que des doses bien plus fortes (8 gouttes pour 30 cm³), et pour lesquelles la condensation diminue, qui réalisent peut-être la désamination avec production d'ammoniaque qu'on a pu signaler pour l'action de $H^2O^2$ sur les protides.

Nous avions à cœur de confirmer par d'autres investigations la condensation apparue dans les résultats de la formoltitration. Nous avons examiné dans ce but les précipitations par l'acide trichloracétique, par la chaleur en milieu acétique, par le sulfate d'ammoniaque et par le sulfate de magnésie, qui sont susceptibles de mettre en évidence des molécules condensées, alors que les peptides résultant de la lyse initiale sont peu ou pas précipitables.

Quelquefois, nous nous sommes contenté de noter l'intensité du trouble produit, dans d'autres cas, nous l'avons mesuré par opacimétrie ou encore nous avons dosé au micro-Kjeldahl l'azote du précipité recueilli. Dans tous les cas, la diminution de l'azote aminé libre va de pair avec l'augmentation des corps précipitables, donc condensés. Le protocole de l'expérience 152 illustre ce que nous venons de dire.

Exp. 152. — Gélatine 5 p. cent dans tampon de phosphates à pH 6,8 + 0,4 p. cent de papaïne + ferrocyanure, 56 heures d'étuve (= 1er temps), ensuite répartition en lots, 48 heures d'étuve (= 2e temps).

| | Potentiel final en mV | N formoltitrable en NaOH n/25 pour 3 cm³ | $NH^3$ en NaOH n/25 pour 3 cm³ | Trouble par $Am^2SO^4$ à saturation | Opacimétrie relative du trouble par $MgSO^4$ à saturation |
|---|---|---|---|---|---|
| Fin d'hydrolyse (1er temps). . . . . | | 6,3 | 0,4 | (+) | 1,1 |
| Fin d'expérience (2e temps) : | | | | | |
| Etuve, sans addition. | | 6,3 | 0,5 | (+) | 1,15 |
| — $+H^2O^2$ 1 gtte | + 445 | 5,4 | 0,4 | + | 1,75 |
| — — 3 gttes | + 506 | 5,2 | 0,45 | +++ | 1,70 |
| — — 8 gttes | + 552 | 5,5 | 0,6 | + | 1,65 |

Dans une autre expérience, on dose l'azote du précipité trichloracétique de 35 cm³ de milieu : on trouve 8,0 à la fin du premier temps d'hydrolyse ; l'action de $H^2O^2$ pendant 48 heures à 37° amenant le potentiel à +583 mV fait monter la valeur de l'azote précipitable à 14,3.

Les résultats d'une précipitation par la chaleur peuvent être faussés en présence de ferricyanure qui agit comme déféquant bien que nous ayons tout lieu de croire que les quantités mises en jeu dans nos expériences sont trop faibles pour agir ainsi. Néanmoins, nous avons fait des essais en activant la papaïne par CNK au lieu de ferrocyanure. Le protocole 157 a trait à une telle expérience.

Expérience 157. — Même technique que pour l'expérience 154, mais activation par CNK.

| | Potentiel final en mV | N formoltitrable en cm³ NaOH n/25 pour 3 cm³ | Précipité par la chaleur en milieu acétique | N total de ce précipité |
|---|---|---|---|---|
| Fin d'hydrolyse (premier temps) . . . . . | | 6,2 | 0 | |
| Fin d'expérience (deuxième temps). . . . . | | | | |
| Etuve, sans addition. . | + 270 | 7,2 | 0 | |
| $+H^2O^2$ 1/10 1 goutte | + 260 | 6,3 | 0 | |
| Idem. 3 gouttes | + 364 | 6,0 | ++ | 1,6 |
| $H^2O^2$ pure 3 gouttes | + 475 | 6,1 | ++ (+) | 0,9 |

Nous rapportons également un essai (N° 158) dans lequel la caséine a servi de substrat et CNK d'activateur.

Expérience 158. — Caséine solubilisée à la soude, 5 p. cent, papaïne 0,4 p. cent, CNK, tampon de phosphates à pH 6,2, hydrolyse 3 jours, puis mise en expérience en lots restant 48 heures à l'étuve.

| | Potentiel final en mV | N formoltitrable en cm³ NaOH n/25 pour 3 cm³ | Aspect final | N total du précipité par la chaleur en milieu acétique |
|---|---|---|---|---|
| Témoin glacière initial. | | 4,5 | | mg |
| Fin d'hydrolyse (premier temps) ..... | | 7,45 | limpide | 9,1 |
| Fin d'expérience (deuxième temps). ..... | | | | |
| Etuve, sans addition.. | | 7,6 | » | 5,8 |
| + $H^2O^2$ 1/5e 1 goutte. | + 348 | 7,0 | » | 12,0 |
| + $H^2O^2$ 1/5e 3 gouttes | + 388 | 7,1 | léger trouble | 22,6 |
| — 1, 1 goutte. | + 374 | 7,1 | limpide | 19,3 |
| — 1, 5 gouttes | + 495 | 7,1 | trouble | 25,4 |

Toutes nos investigations confirment donc la condensation des produits d'hydrolyse de la gélatine par la papaïne dans un milieu oxydant à condition que le potentiel du milieu se trouve entre les limites fixées précédemment : l'azote formoltitrable baisse sans que l'ammoniaque augmente (sauf en forçant les doses de $H^2O^2$ bien au-delà de la quantité utile) ; des substances précipitables par $Am^2\ SO^4$ apparaissent alors qu'il n'y en avait plus dans l'hydrolysat et il en est de même pour la précipitation par la chaleur en milieu acétique ; les fractions précipitables par $Mg\ SO^4$ augmentent. Avec la caséine comme substrat, l'azote précipitable par la chaleur n'a pas complètement disparu à la fin de la lyse, mais en présence d'oxydants, il augmente dans le rapport de 25 à 9. Notons encore que dans le deuxième temps de nos expériences (voir fig. 33 et les expériences 154, 157 et 158), la lyse peut encore continuer si l'on n'ajoute pas d'oxydant, le potentiel restant alors au-dessous d'une certaine limite.

Nous pouvons donc conclure que *le même enzyme peut réaliser la condensation ou la lyse dans les mêmes conditions de concentration du substrat et des activateurs suivant les conditions de potentiel d'oxydation-réduction du milieu.* Pour l'action condensante de la papaïne sur l'hydrolysat de gélatine à pH 6,5 l'optimum de potentiel se trouve entre +450 et +570 mV (entre rH 28,5 et 33,3).

### Expériences avec d'autres enzymes.

Nous avons fait de nombreuses expériences avec la *pepsine* (préparation HELLBORN-GRUEBLER purissimum, titre 1 :5000). De la gélatine ou du blanc d'œuf séché ont été digérés à pH 2 environ. L'hydrolysat a été amené ensuite à différents pH et à différents potentiels et remis à l'étuve. Mais aucune condensation nette n'a été observée. Nous n'avons pas eu davantage de résultats positifs en faisant agir de la pepsine sur des peptones de WITTE à pH 6 et à différents potentiels.

Nous avons également fait des essais de condensation avec des extraits d'*Orge*. Sur dix séries, trois seulement ont donné des résultats positifs. Nous citons une expérience à titre d'exemple. Un extrait d'Orge, préparé comme dans les expériences d'autolyse (voir p. 45), a été maintenu 4 jours à 37°, additionné d'un tiers du volume de glycérine et laissé encore un jour à l'étuve. Nous avions, en effet, vu que la glycérine

| LOTS | Potentiel final en mV | N aminé libre en cm³ NaOH n/25 | Variation par rapport au témoin en % |
|---|---|---|---|
| Témoin glacière. . . . . | | 0,76 | |
| Etuve sans addition. . . . | + 268 | 0,77 | + 1 |
| — agité . . . . . | + 272 | 0,74 | — 3 |
| — fermé sans air. . . . | + 108 | 0,76 | 0 |
| Etuve, + bleu de méthylène, réduit à l'hydrosulfite . . . . . | — 25 | 0,75 | — 1 |
| Etuve, idem. . . . . | — 98 | 0,75 | — 1 |
| Etuve, + persulfate Na, trace . . . . . | + 352 | 0,75 | — 1 |
| Etuve, idem, quantité plus forte . . . . . | + 440 | 0,70 | — 8 |
| Etuve, + ferricyanure, trace . . . . . | + 290 | 0,76 | 0 |
| Etuve, idem., quantité plus forte . . . . . | + 337 | 0,70 | — 8 |
| Etuve, + $H^2O^2$ neutralisée. . . . . | + 290 | 0,70 | — 8 |
| Etuve, idem, quantité plus forte . . . . . | + 325 | 0,64 | — 16 |
| Etuve, idem, quantité plus forte . . . . . | + 530 | 0,67 | — 12 |

ne gêne pas l'hydrolyse et sa présence nous paraissait pouvoir favoriser une condensation avec élimination d'eau. Dans ces conditions, l'hydrolyse semble avoir atteint son maximum. Le milieu est ensuite réparti en lots additionnés ou non de différents réactifs et remis à l'étuve pour 24 heures avec un témoin gardé à la glacière. Le tableau de la page précédente donne le résultat de la formoltitration.

Il résulte de cette expérience qu'une condensation est possible au-dessus de +300 mV, mais l'inconstance des résultats montre que nous n'avons pas saisi tous les facteurs nécessaires.

Nous avons faits différents essais avec des extraits d'*hépatopancréas* agissant sur la gélatine. Nous reproduisons le protocole 146 comme exemple d'une technique qui a donné des résultats positifs :

Expérience 146. — Un extrait glycériné d'hépatopancréas de Crabe (*Carcinus maenas*), agit pendant huit jours à l'étuve sur de la gélatine à 2,5% en présence de phosphates à pH 9. Le milieu est ensuite réparti en lots, additionné de réactifs et encore laissé trois jours à l'étuve.

| LOTS | Potentiel final en mV | N formoltitrable en cm³ NaOH n/25 sur 3 cm³ | Variation en % |
|---|---|---|---|
| Témoin glacière. (fin du premier temps) ..... | | 9,1 | |
| Fin d'expérience (2e temps) : | | | |
| Etuve sans addition. . . . . | + 250 | 9,3 | + 2 |
| — + ferricyanure de K. . | + 345 | 9,6 | + 6 |
| Idem, quantité plus forte. . . . | + 435 | 9,1 | 0 |
| — + perborate de Na . . . | + 292 | 8,0 | —12 |
| — + $H^2O^2$. ..... | + 351 | 8,2 | —10 |
| Idem, quantité plus forte. . . | + 426 | 7,5 | —18 |

Les potentiels élevés peuvent donc déterminer une condensation qui n'existe pas aux potentiels bas. Les mêmes séries réalisées à pH plus bas donnent des résultats négatifs.

La *paroi musculaire de l'Arénicole* a été utilisée dans sept séries d'expériences réalisant des conditions variées. L'hydrolyse se fait à pH 7 pendant 3-4 jours. Ensuite, le pH est ajusté à 7,0, 6,0 ou 5,5 et des lots sont confectionnés par addition de divers réactifs oxydants ou réducteurs. On conserve encore pendant 48 heures et on dose l'azote formoltitrable de même qu'on mesure le potentiel de platine. Dans les lots amenés à pH 7,0 ou 6,0, nous n'avons eu aucun résultat positif de condensation. Dans les lots à pH 5,5 par contre, on observe des variations de N formoltitrable changeant de signe suivant le potentiel. Les lots sans addition se placent près

de +350 mV. Le dosage montre que les groupements aminés libres s'y maintiennent au niveau atteint à la fin du premier temps d'hydrolyse, ils peuvent encore augmenter dans les lots réduits. Aux environs de +450 mV on note des diminutions notables, mais aussi quelques augmentations (à la limite de la précision de dosage : 1 à 2%). Entre +500 et +600 mV, tous les lots présentent une diminution de l'azote aminé libre atteignant 7%. Au-delà de +600 mV, les valeurs semblent se maintenir au niveau de départ de la fin de l'hydrolyse.

Quelques essais avec le *muscle de Tanche* ont abouti à des condensations que nous n'avons toutefois pas réussi à reproduire dans toutes les séries. Aux environs de +500 mV, la condensation atteint 6 p. cent, elle ne se produit jamais aux potentiels plus bas. Nous donnons un protocole à l'appui (exp. 12).

Expérience 12. — Muscle de poisson d'eau douce (Tanche).
Purée amenée à pH 5,57, 6 jours à 37°, addition de 1/10e de volume de purée fraîche, 4 jours à 37° (fin du 1er temps), répartition en lots, 4 jours d'étuve.

| LOTS | Potentiel final en mV | N formoltitrable en cm³ NaOH n/25 pour 3 cm³ de milieu | Variation par rapport au témoin en % |
|---|---|---|---|
| Fin du 1er temps. ..... | | 6,25 | |
| Fin du 2e temps : | | | |
| Etuve, sans addition. .. | + 306 | 6,37 | + 2 |
| — fermé sans air ... | — 130 | 6,48 | + 4 |
| Etuve + bleu de méthylène, fermé sans air. .. | — 30 | 6,38 | + 2 |
| Etuve + bleu de méthylène réduit ..... | — 66 | 6,68 | + 7 |
| Idem ..... | — 15 | 6,40 | + 2 |
| Etuve, + ascorbate Na. | — 45 | 6,45 | + 3 |
| Et. + $H^2O^2$ 1/10e goutte | + 305 | 6,26 | 0 |
| — 1/4 goutte . | + 436 | 6,36 | + 2 |
| — 1/2 goutte. . | + 490 | 5,93 | — 5 |
| — 1 goutte. ... | + 527 | 5,98 | — 4 |

Nous attirons à ce sujet l'attention sur quelques points de nos expériences d'autolyse consignées dans la figure 18. L'autolyse du muscle de Tanche baissant avec l'élévation de potentiel s'annule aux environs de +500 mV. Mais dans les lots où le potentiel dépasse cette valeur, on trouve une condensation qui se fait donc, même en l'absence d'hydrolyse préalable. Elle se fait peut-être sur des constituants protidiques plus lourds que dans l'expérience ci-dessus, mais dans les mêmes conditions de potentiel.

Nous relevons également une technique qui nous a donné des résultats positifs avec la *pulpe de rate* (voir un exemple : exp. 198).

Expérience 198. — De la pulpe de rate de veau est préparée comme dans les expériences de lyse (p. 59) et amenée à pH 4,9. Après 15 jours de séjour à l'étuve, on ajoute 1/10e de volume de pulpe ayant subi un jour d'hydrolyse (en vue de renouveler le stock d'enzymes) (fin du 1er temps). On amène à pH 6 et on répartit en lots qu'on maintient 24 heures à l'étuve.

| LOTS | Potentiel final en mV | N formoltitrable en cm³ NaOH n/25 pour 1 cm³ de milieu | Variation par rapport au témoin en % |
|---|---|---|---|
| Fin de l'hydrolyse (premier temps) : | | | |
| Conservé glacière avant ajustement du pH.... | | 8,02 | |
| Idem., après ajustement du pH. ..... | | 8,07 | |
| Fin du 2e temps : | | | |
| Sans addition. ..... | + 312 | 7,80 | — 3 |
| + ferricyanure de K. ... | + 316 | 7,95 | — 1 |
| + persulfate de Na..... | + 315 | 7,60 | — 5 |
| Idem., quantité plus forte | + 550 (1) | 7,62 | — 5 |
| + $H^2O^2$ (2)..... | + 383 | 7,72 | — 4 |
| + ferricyanure et $H^2O^2$.. | + 421 | 7,33 | — 9 |

(1) Dans ce lot le pH est descendu à 5,2.
(2) $H^2O^2$ est partiellement décomposé dès l'addition.

Il en résulte qu'il doit y avoir à pH 6 un optimum de condensation au-dessus de +421 mV.

Avec le *cristallin* de Bœuf et de veau, 12 séries d'expériences ont été faites en vue d'une condensation. La technique est la suivante : les cristallins sont préparés comme pour les expériences d'hydrolyse ; la suspension amenée à pH 6 et addi-

tionnée de toluène est maintenue à l'étuve à 38° pendant 4 à 8 jours. Dans ces conditions, l'azote formoltitrable augmente dans des proportions variables d'une expérience à l'autre, de moitié environ. La digestion se trouve pratiquement arrêtée au bout de quelques jours, mais il ne s'agit pas d'une destruction des enzymes, car en plaçant des échantillons prélevés après 9 jours dans des conditions plus favorables, c'est-à-dire en abaissant le potentiel, la digestion reprend. Au cours du séjour à l'étuve, il se forme quelquefois un précipité : dans ce cas, nous décantons ou filtrons. Le liquide obtenu est amené à pH 7,5 à 8 et réparti en plusieurs lots. Un lot est placé à la glacière comme témoin, d'autres, additionnés de divers réactifs, sont placés à l'étuve pour 48 heures. Ensuite, on y mesure le potentiel et on dose l'azote aminé. Dans les lots à potentiel bas la digestion continue ; dans le lot placé à l'étuve sans addition il n'y a le plus souvent pas de variation par rapport au témoin refroidi. Dans les lots contenant des oxydants, on observe avec le veau (et aussi le Mouton) des troubles allant jusqu'à la prise en masse caséeuse. Avec du cristallin de Bœuf, nous n'avons pas observé de phénomène analogue. Les oxydants employés sont l'eau oxygénée neutralisée, le ferricyanure de K et l'hypochlorite de Na en solution pure très diluée. Les concentrations intéressantes sont de l'ordre de 1-2 gouttes de $H^2O^2$ à 100 volumes pour 5 $cm^3$ de milieu, de 0,1-0,5 mg de ferricyanure et de 1-3 gouttes d'une solution d'hypochlorite de 10° chlorométriques diluée au 25e. On note des diminutions de l'azote formoltitrable atteignant 16 p. cent de la valeur de départ après hydrolyse. Quant aux potentiels mesurés, voici comment se répartissent les lots dans lesquels on a observé des diminutions indiscutables de l'azote formoltitrable (dépassant 6 p. cent) (fig. 34). Il n'y en a pas dans la

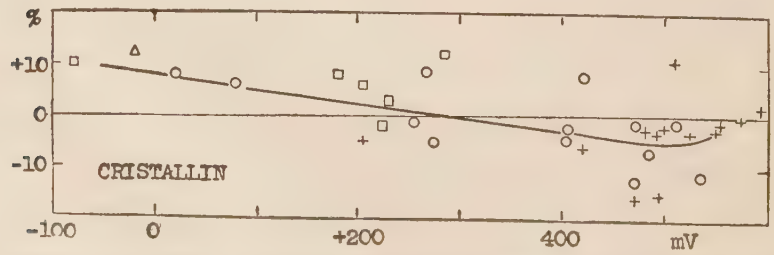


Fig. 34. — Variation, en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu de l'azote formoltitrable d'une suspension de matière cristallinienne, en p. cent de la valeur atteinte par une autolyse préalable.

Lots réalisés sans addition ■, lots réalisés par addition d'eau oxygénée 0, de ferricyanure +.

zone des potentiels bas. Tous les résultats nets correspondent à des potentiels supérieurs à +200 mV. Dans la zone autour de +300 mV, 14 p. cent des expériences montrent des condensations dépassant 8 p. cent de l'azote aminé ; autour de +400 mV, on trouve ce résultat dans 40 p. cent des lots, autour de +500 mV dans 36 p. cent des lots. Autour de +600 mV, on n'observe plus de condensation. Ni dans cette statistique ni dans la fig. 34 nous n'avons pu tenir compte des lots réalisés avec de l'hypochlorite en raison de l'instabilité du potentiel ; on y observe cependant des condensations du même ordre de grandeur.

Avec le *corps vitré*, 14 séries comprenant 114 lots ont été expérimentées. La technique est semblable à celle employée avec le cristallin : 4 à 12 jours de digestion de vitrés filtrés à l'étuve à 38° après établissement d'un pH de 6,5 environ et en présence de toluène. A la fin de cette digestion, le liquide clair est amené à pH 7,5 à 8 et réparti en lots additionnés ou non de réactifs divers. Les quantités d'oxydants utiles sont plus faibles que pour le cristallin. Après 48 heures de séjour à l'étuve, on mesure les potentiels et on dose l'azote aminé. Comme pour le cristallin, il peut encore augmenter dans les lots amenés à des potentiels bas, il ne change pas aux environs de +200 mV ; aux environs de +400 à +500 mV, on trouve dans sensiblement un tiers des lots une condensation dépassant 8 p. cent de l'azote aminé initial (fig. 35). La plus forte con-

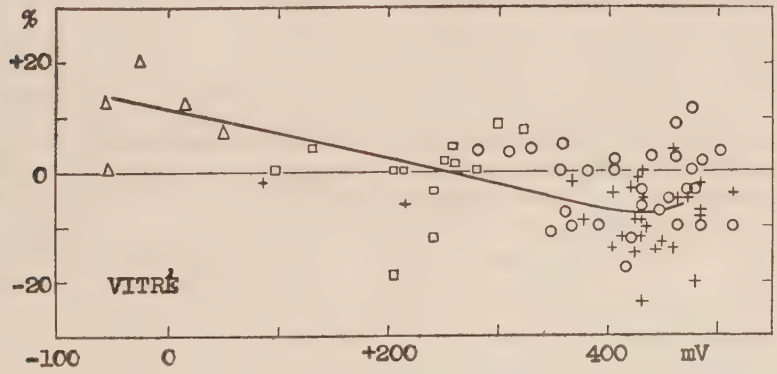


Fig. 35. — Variation ,en fonction du potentiel d'oxydation-réduction du milieu, de l'azote formoltitrable de corps vitré, en p. cent de la valeur atteinte par une autolyse préalable.

Lots réalisés sans addition ■, lots réalisés par addition d'eau oxygénée 0, de ferricyanure +, de réducteurs Δ.

densation observée est de 24 p. cent à +433 mV. Dans quelques échantillons ayant été placés à l'étuve sans addition d'oxy-

dants, nous avons observé des condensations nettes et ceci surtout quand l'alcalinisation faite après la lyse a été relativement plus importante. Il se pourrait donc que la variation de pH à elle seule pût agir comme les oxydants (notons que le rH monte dans les deux cas). Dans les conditions de nos expériences, le processus de condensation n'est pas terminé au bout de 18 heures, délai habituel de nos dosages. Nous avons suivi des lots au-delà de ce terme et nous avons constaté qu'aussi bien avec le ferricyanure qu'avec $H^2O^2$ et même par la simple alcalinisation la condensation continue à évoluer, de même d'ailleurs que la lyse, dans les lots à potentiel bas. Il ne s'agit donc pas d'un équilibre rapidement atteint, mais d'une lente action enzymatique.

Nous avons fait des expériences avec une catepsine extraite du *foie* de Bœuf. Ce matériel paraît à première vue favorable : d'après Rosenbohm, le tissu hépatique est un de ceux qui s'autolysent le plus facilement. Des essais d'alimentation de Rats avec des acides aminés contenant du deutérium ont montré à Ussing qu'en 3 jours, 10 p. cent des protéines du foie sont néoformés alors que dans d'autres tissus, ce taux atteint au plus 2,5 p. cent. Les échanges azotés sont donc intenses dans le foie. L'enzyme est en plus très résistant (Eder, Bradley et Belfer). Pour l'autolyse, on a signalé l'activation par le chlorure manganeux (Bradley et Morse) et par les sels ferreux, alors que les chlorures cuivriques et mercuriques inhibent (Stern). Le manque d'oxygène accélère l'autolyse, l'aération la ralentit (Laqueur). L'iodate (Luck), le bromate et le persulfate (Joergensen) ont également une action inhibitrice ; la cystéine active considérablement (Anson). Ces données paraissent bien relever d'une intervention du potentiel d'oxydation-réduction : la catepsine est activée par les réducteurs et inhibée par les oxydants. Pour nos essais de synthèse nous nous sommes écarté de la technique habituelle : au lieu d'opérer sur un extrait aqueux total, nous avons cherché à isoler la catepsine et les protides de bas poids moléculaire dans l'espoir de réaliser une synthèse dans un milieu moins complexe. On broie au sable 75 g. de foie de Bœuf, on délaie avec 100 $cm^3$ d'eau et, après une heure de macération, on porte rapidement à 70° et on refroidit immédiatement avec de la glace. On se débarrasse par centrifugation des protéines précipitées. Le liquide obtenu est additionné d'acétone, filtré et réduit dans le vide jusqu'à disparition de l'acétone. On obtient ainsi un liquide à pH 6,8 dont l'azote formoltitrable est contrôlé au cours d'un séjour à l'étuve après établissement de potentiels d'oxydation-réduction variables. Nous n'avons pas observé de condensation nette. De nombreuses courbes de neu-

tralisation effectuées avant et après séjour à l'étuve (voir un exemple, fig. 2) montrent que les caractéristiques physico-chimiques sont modifiées par ce traitement, sans que cependant une diminution appréciable de la bande de pouvoir tampon décalée par l'action du formol (effet tampon des groupements aminés libres) accuse une condensation. Nous attribuons cet échec au fait que la technique suivie supprime les cosubstrats, coferments et certains activateurs dont nous avons suggéré l'importance et qui se trouvent éventuellement dans un extrait aqueux total.

## Discussion

### Point de vue physico-chimique.

Résumons les résultats que nous venons d'exposer : les condensations de protides sont possibles par renversement du sens de l'action enzymatique correspondant à la protéolyse et ceci par le seul changement du pH et du potentiel d'oxydation-réduction du milieu. Mais cette condensation ne se retrouve pas à coup sûr dans des expériences conduites d'une façon aussi semblable que possible. D'autres facteurs (massivité, structure du milieu, etc.) que nous n'avons pas étudiés peuvent donc éventuellement intervenir. Toujours est-il que la condensation peut être réalisée à l'abri des causes d'erreur éventuelles que nous avons spécialement examinées et éliminées dans l'exemple de la papaïne. Dans tous les cas, un potentiel d'oxydation-réduction élevé semble nécessaire pour que la diminution des groupements aminés libres (ainsi que l'augmentation de l'azote précipitable par divers réactifs) traduise une condensation de protides en plus grosses molécules par formation de liaisons peptidiques.

Que signifient les condensations que nous avons observées ? Représentent-elles réellement l'équivalent des synthèses dans l'organisme vivant ? Rien n'est moins certain. Alcock n'est pas convaincu que la synthèse des protéines *in vivo* se fasse par condensation d'acides aminés ; dans ce cas, la production de plastéines et les phénomènes que nous avons étudiés seraient donc très différents de ce qui se passe dans l'organisme. Même en allant moins loin, il suffit d'admettre la structure en cyclol des protéines natives (voir Langmuir et Wrinch) pour conclure que la condensation artificielle des acides aminés aboutissant vraisemblablement à des chaînes polypeptidiques ne réalisera pas l'édifice de la molécule naturelle dont les voies de synthèse seraient d'ailleurs inconnues. C'est bien en raison de ces réserves que nous parlons d'une condensa-

tion et de fermeture de liaisons peptidiques et non pas de synthèse de protéines natives..

D'après Linderstroem-Lang, la condensation d'acides aminés se heurterait à une difficulté thermodynamique. La réaction $R_1CO^2H + NH^2R_2 \rightarrow R_1CONHR_2 + H^2O$ n'exige qu'un apport d'énergie faible, mais si les corps entrant dans la réaction sont ionisés elle met en jeu des quantités d'énergie qui, d'après Linderstroem-Lang, pourraient interdire sa réalisation ou au moins entraîneraient un équilibre fortement déplacé vers l'hydrolyse. Ce ne serait que dans des cas spéciaux, par la valeur de la constante de dissociation des corps réagissants, par exemple de l'aniline dans les expériences de Bergmann, que la condensation pourrait atteindre des proportions intéressantes. Mais l'auteur constate lui-même que les conditions d'une condensation sont plus favorables si le matériel de départ est représenté par des peptides au lieu d'acides aminés. C'est vraisemblablement le cas de nos expériences dans lesquelles l'hydrolyse préalable n'a pas été poussée jusqu'à son terme ultime. Pour ce qui est d'une synthèse éventuelle *in vivo* à partir d'acides aminés il est possible d'envisager la réaction aux dépens des fractions non dissociées des acides aminés, étant donné que la condensation enzymatique est différente de la salification qui mettrait au contraire en jeu les fractions dissociées. En plus, les produits de synthèse dans l'organisme vivant auront tendance à sortir de phase en servant de matériel pour des structures microscopiques et permettront ainsi à la réaction de continuer.

Schaeffer et le Breton relèvent le désaccord existant dans la littérature entre les données numériques de variation d'énergie libre correspondant aux réactions d'hydrolyse ou de condensation. Les données de Borsook et Keighley fournissent le chiffre de 56 calories d'endothermie par liaison peptidique fermée qui est sans rapport avec les valeurs connues sur la lyse. Mais il nous semble difficile de tirer de ces données une indication utile sur la possibilité de synthèse tant que nous ignorons les variations éventuelles de la dissociation électrolytique des groupements libres et les possibilités d'apport d'énergie par des réactions couplées.

Il convient de comparer les conditions de potentiel que nous avons établi pour l'hydrolyse, d'une part, pour la condensation, d'autre part. Le tableau IV résume nos résultats. Il fait apparaître immédiatement que la condensation se fait toujours à un rH élevé et situé en dehors de la zone d'activité hydrolytique forte.

Cette conclusion tirée des résultats numériques est illustrée par un graphique (fig. 36) qui résulte de la juxtaposition

des courbes de lyse et de condensation en fonction du rH pour un même système fermentaire. L'influence du rH, c'est-à-dire du pH et du potentiel d'oxydation-réduction du milieu, apparaît clairement. L'action des mêmes enzymes est dirigée vers la lyse ou la synthèse suivant le rH du milieu, à condition évidem-

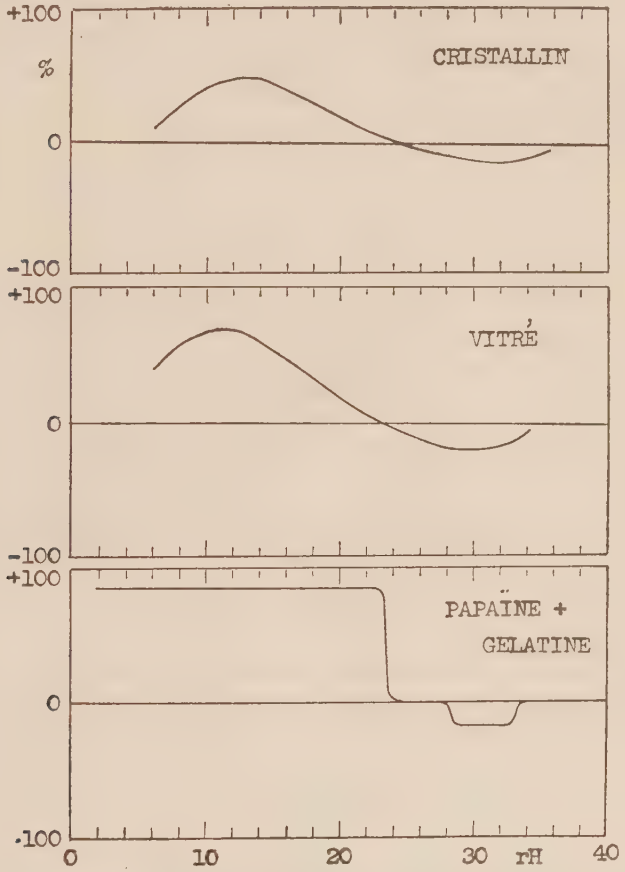


Fig. 36. — Résumé schématique de graphiques donnant l'activité des systèmes protéasiques du cristallin, du corps vitré et de l'action de la papaïne sur la gélatine en fonction du rH du milieu.

En abscisses, le rH, en ordonnées les variations de l'azote formoltitrable (dans le sens positif les hydrolyses, dans le sens négatif les condensations).

ment que la composition du milieu (substrat, etc..., soit compatible avec la réaction envisagée. La réaction est orientée dans le sens de l'hydrolyse au-dessous d'une valeur critique de rH (à savoir dans les milieux faiblement réducteurs) et vers la

condensation au-dessus de cette valeur (à savoir dans les milieux oxydants). Ces valeurs critiques sont de rH 26 environ pour la papaïne, rH 25 pour le cristallin et rH 23 pour le corps vitré. Dans d'autres cas la valeur critique est moins précisée par nos expériences (1). Sauf dans le cas de la papaïne l'activité enzymatique présente un optimum au-dessous et un autre au-dessus du point critique.

Les caractéristiques physico-chimiques du milieu interviennent donc à la fois pour déterminer la vitesse et le sens de la réaction catalysée (2).

---

**Point de vue biologique.**

Les valeurs trouvées jettent une lumière sur le fonctionnement des protéinases dans l'organisme vivant. Le rH intérieur des cellules vivantes dans des conditions normales d'aérobiose se trouve aux environs de rH 20 (voir Aubel et Lévy). Il est sensiblement intermédiaire entre nos valeurs donnant l'optimum pour la lyse et la condensation. Il pourrait donc y avoir dans la cellule vivante un équilibre entre les lyses et les synthèses. Le problème de savoir pourquoi les enzymes protéolytiques contenus dans les cellules vivantes ne lysent pas *in vivo* les protéines cellulaires trouverait une solution satisfaisante : il ne s'agirait pas d'enzymes spécifiquement protéolytiques, mais de protéinases pouvant catalyser les réactions des protides dans le sens d'une lyse aussi bien que de la synthèse (3) suivant les conditions du milieu, et ces conditions sont telles dans la

(1) Il est probable que des propriétés du milieu que nous n'avons pas étudiées interviennent pour déplacer ce point neutre de l'activité enzymatique dans l'échelle des rH en favorisant d'une façon générale la lyse ou la condensation. Les valeurs de rH correspondant aux optima d'activité dans un sens ou dans l'autre nous semblent, par contre, plus indépendants d'autres facteurs et par conséquent plus caractéristiques des actions enzymatiques envisagées.

(2) Pour le fonctionnement de l'uréase TONO entrevoit un déterminisme analogue : il note une accélération de l'uréolyse par les réducteurs, une inhibition par les oxydants et une inversion du sens de l'action (synthèse de l'urée) par une modification du potentiel d'oxydation-réduction du milieu.

(3) Un argument en faveur de l'identité des enzymes lysants et synthétisants est fourni par le travail de Kestner qui montre que les organes présentant dans l'organisme adulte des phénomènes de construction cellulaire et de régénération, telle la rate, possèdent des enzymes catalysant l'autolyse, alors que des organes dont la structure tissulaire est fixée chez l'adulte, tels le cerveau ou la glande thyroïde, n'en possèdent pas.

TABLEAU IV

| *Système protéasique.* | *Hydrolyse* | | | | *Condensation* | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | pH | rH correspondant à la réduction de moitié de l'activité maximale | | rH optimum | pH | rH optimum |
| | | limite inférieure | limite supérieure | | | |
| *Digestion avec substrat étranger.* | | | | | | |
| Papaïne-gélatine..... | 4,8 | — | 23,4 | — | 6,5 | 28,5-33,3 |
| | 5,5 | — | 23,6 | — | | |
| | 6,3 | — | 23,3 | — | | |
| | 6,8 | — | 22,8 | — | | |
| Hépatopancréas de Poulpe-gélatine..... | 7,3 | — | 28 | 13 | — | — |
| Pepsine-gélatine..... | 2,0 | | | néant | | néant |
| *Systèmes autolytiques.* | | | | | | |
| Graine d'Orge..... | 6,0 | 7 | 24 | 13,7 | — | — |
| | 7,0 | | | 15,7 | | |
| | 8,0 | | | 14,3 | | |
| Idem. avec glycérine.... | 7,0 | — | 21 | 14,0 | | |
| Paroi d'Actinie ..... | 5,0 | 9 | 28 | 16,9 | — | — |
| | 6,7 | | | 16,6 | | |
| | 8,0 | | | 16,0 | | |
| Paroi de l'Arénicole .... | 7,0 | 10 | 27 | 14,0 | 5,5 | 29 |
| Muscle de Tanche. . . . | 4,3 | 6 | 21 | 13,8 | 5,5 | 28 |
| | 5,5 | | | (9,3 et) 16,1 | | |
| | 3,8 | | | 14,6 | | |
| Rate de veau ..... | 4,9 | 8 | 21 | 13,2 | 6,0 | 27 |
| | 6,2 | | | 15,8 | | |
| Cristallin de veau. . . .... | 6,5 | 7 | 21 | 13,0 | 7,5-8 | 33 |
| Cristallin de Bœuf. ..... | 6,5 | 10 | 28 | 13,0 | — | — |
| Corps vitré de veau. .... | 7,0 | 7 | 18 | 10,6 | 7,5-8 | 31 |
| Corps vitré de Bœuf. .... | 7,0 | (7) | 22 | 15,7 | — | — |

cellule vivante qu'aucune des deux activités ne serait absolument favorisée aux dépens de l'autre. Il y a un équilibre qui doit être sensible aux moindres variations du rH intracellulaire et évoluer ainsi vers une prédominance relative de l'un ou l'autre sens de la catalyse : lyse ou synthèse.

Nous avons tenté dans de nombreux cas d'obtenir des condensations à des pH variés. Sans que nous puissions tirer une conclusion ferme en raison du trop petit nombre d'essais, nous avons cependant été frappé par le fait que nous n'avons eu de résultats positifs de condensation qu'en nous rapprochant du pH auquel se trouve le système examiné dans l'organisme vivant. Ainsi les systèmes intracellulaires (rate, muscle) n'ont donné de résultats positifs qu'à pH 5,5 et 6, ce qui correspond approximativement au pH intérieur des cellules normales (voir Reiss). Pour le cristallin et le corps vitré, le pH favorable est plus élevé en accord avec les mesures de pH de ces milieux dans l'organisme vivant (Redslob et Reiss, Nordmann et Reiss). Cette constatation s'oppose au fait que les optima de pH pour la lyse sont le plus souvent assez éloignés du pH normal et plus bas que celui-ci. L'asphyxie d'un organisme orienterait, par conséquent, l'activité des protéinases intracellulaires vers la lyse, à la fois par l'acidification et par l'abaissement du potentiel d'oxydation-réduction.

Nous avons pu invoquer ce mécanisme pour l'histolyse saisonnière de l'Arénicole, mais il peut intervenir d'une façon plus ou moins discrète dans d'autres cas. Les mauvaises conditions d'oxygénation, dans les plaies contuses, par exemple, amèneraient la protéolyse, alors que la riche vascularisation des tissus jeunes créerait les conditions nécessaires à une synthèse.

## CONCLUSIONS

1. L'activité protéolytique de la papaïne ne s'exerce qu'en milieu réducteur ; elle est nulle au-dessus de rH 23 environ.

2. La pepsine n'est apparemment pas sensible aux conditions d'oxydation-réduction du milieu.

3. Les autolyses de suspensions de différents tissus, examinées à des pH variés, dépendent du potentiel d'oxydation-réduction du milieu : la vitesse de l'hydrolyse protéique présente un optimum dans les milieux faiblement réducteurs. La lyse est inhibée par les potentiels élevés, ainsi que par les potentiels très bas. Cette inhibition est réversible (1).

4. Exprimées en fonction du rH les courbes d'activité protéolytique sont indépendantes du pH du milieu pour un même système enzymatique.

Ces courbes sont très voisines pour les différents systèmes étudiés ; les optima se groupent autour de rH 14 (voir tableau IV et figure 32).

5. Les systèmes autolytiques étudiés peuvent présenter une activité condensante si, après hydrolyse préalable, on réalise un potentiel d'oxydation-réduction élevé à un pH voisin de celui de l'organisme. L'optimum de cette condensation se place aux environs de rH 30 pour les systèmes autolytiques examinés ainsi que pour la papaïne.

6. Le rH du milieu peut donc orienter l'activité d'une protéinase vers l'hydrolyse (rH bas) ou la condensation (rH élevés). L'inversion du sens de l'action se place aux environs de rH 25.

7. Les conditions de rH réalisées dans l'organisme normal sont intermédiaires entre l'optimum de lyse et l'optimum de synthèse, déterminés *in vitro* : on peut admettre que les variations éventuelles de rH (physiologiques, pathologiques ou expérimentales) orientent l'activité des enzymes intracellulaires vers une prédominance de la lyse (par abaissement du rH) ou de la synthèse (par augmentation du rH).

(1) La papaïne occupe une place à part dans la série de nos expériences en ce sens que nous n'avons pas pu la faire agir sur son substratum naturel alors que dans tous les autres cas étudiés nous avons cherché à respecter la composition du milieu originaire de l'enzyme.

Le comportement de la pepsine, ferment digestif, se distingue de celui des enzymes intratissulaires.

## BIBLIOGRAPHIE


AGREN (G.) et HAMMARSTEN (E.). — The disappearance of amino-nitrogen from cell-free liver-extracts. *C.R. Lab. Carlsberg* (série chimique), 1938, XXII, 25.

ALCOCK (R.S.). — The synthesis of proteins *in vivo*. *Physiol. Rev.*, 1936, XVI, 1-18.

ANSON (M.L.). — The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. *J. Gen. Physiol.*, 1937, XX, 565-574. The purification of cathepsin. *Ibid.*, 1940, XXIII, 695-704.

AUBEL (E.) et LÉVY (R.). — Etude du potentiel d'oxydo-réduction dans des organismes vivants. *Ann. Physiol. et Phys.-Chim. Biol.*, 1931, VII, 477-495.

BALBIANO (L.) et TRASCIATTI (D.). — Ueber ein neues Derivat des Glykocolls. *Ber. d. D. chem. Ges.*, 1900, XXXIII, 2323.

BALLS (A.K.) et HOOVER (S.R.). — The milk-clotting action of papain. *J. biol. Chem.*, 1937, CXXI, 737-745.

BALLS (A.K.), LINEWEAVER (H.) et THOMPSON (R.R.). — *Science* (New-York), 1937, LXXXVI, 379.

BARNARD (R.D.). — *J. Gen. Physiol.*, 1933, XVI, 657-675.

BAYER. — Ueber die plasteinogene Substanz. *Hofmeist. Beitr.*, 1903, IV, 554.

BAYLISS (A.). — The kinetics of trypsic action. *Arch. Sc. Biol.*, 1904, II, 291-296.

BEHRENS (O.K.) et BERGMANN (M.). — Cosubstrates in proteolysis. *J. biol. Chem.*, 1939, CXXIX, 587-602.

BERGER (J.) et JOHNSON (M.J.). — The activation of dipeptidases. *J. biol. Chem.*, 1940, CXXXIII, 639-640.

BERGMANN (M.) et BEHRENS (O.K.). — On the asymetric course of the enzymatic synthesis of peptide bonds. *J. biol., Chem.* 1938, CXXIV, 7-10.

BERGMANN (M.) et FRAENKEL-CONRAT (H.). — The role of specificity in the enzymatic synthesis of proteins. Synthesis with intracellular enzymes. *J. biol. Chem.*, 1937, CXIX, 707-720; 1938, CXXIV, 1-6.

BERGMANN (M.) et FRUTON (J.S.). — Some synthetic and hydrolytic experiments with chymotrypsin. *J. biol. Chem.*, 1938, CXXIV, 321-329.

Bergmann (M.) et Ross (W.F.). — On proteolytic enzymes. VIII. The proteolytic systems of papain. *J. biol. Chem.*, 1935, CXI, 659-666: X. The enzymes of papain and their activation. *Ibid.*, 1936. CXIV, 717-725.

Bergmann (M.) et Zervas (L.). — On proteolytic enzymes. IX. The inactivation of papain with iodine. *J. biol. Chem.*, 1936, CXIV, 711-715.

Bergmann (M.), Zervas (L.) et Fruton (J.S.). — On proteolytic enzymes. XI. The specificity of the enzyme peptidase I. *J. biol. Chem.*, 1936, CXV, 593-611.

Bersin (Th.). — Ueber die Einwirkung von Oxydations- und Reduktionsmitteln auf Papain. II. Die Aktivitaetsbeeinflussung durch Licht, Organoarsenverbindungen und Ascorbinsaeure. *Zschr. physiol. Chem.*, 1933, CCXXII, 177-186. Ueber die Thiolnatur des Papains. *Biochem. Zschr.*, 1935, CCLXXVIII, 340-341. Die Bedeutung des Thiol-Disulfid-Systems fuer die Aktivitaet biochemischer Wirkstoffe. *Ver. Ges. Befoerd. ges. Naturw.*, 1936, LXXI, 57-70. Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. 182 p., Leipzig, 1939.

Bersin (Th.) et Koester (H.). — Ueber den Einfluss von Oxydations und Reduktionsmitteln auf Aktivitaet von Papain. *Zschr. physiol. Chem.*, 1935, CCXXXIII, 59-66.

Bersin (Th. et Logemann (W.). — Ueber den Einfluss von Oxydations und Reduktionsmitteln auf die Aktivitaet von Papain. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1933, CCXX, 209-216.

Bierich (R.) et Lang (A.). — Ueber Potentialmessungen an Geschwulstgeweben. *Biochem. Zschr.*, 1936, CCLXXXVII, 411-417.

Blagowestschenski (A.W.). — Ueber die synthetische Wirkung der pflanzlichen Proteasen. *Biochem. Zschr.*, 1926, CLXIIX, 1-5. *Progr. d. l. Chim. biol.*, 1933, XII, 3.

Blagowestschenski (A.W.) et Korman (I.I.). — Zur Frage der Einwirkung von Oxydations und Reduktionsmitteln auf Kathepsin. *Biochem. Zschr.*, 1934, CCLXX, 341-345.

Blagowestschenski (A.W.) et Nikolaeff (K.). — Ueber die Reversibilitaet der Wirkung des Histozyms. *Biochem. Zschr.*, 1935, CCLXXVI, 368-375.

Bohn (G.). — L'histolyse saisonnière. *C.R. Ac. Sc.*, 1901, CXXXIII, 646.

Borsook (H.). — Reversible and reversed enzymatic reactions. *Erg. d. Enzymf.*, 1933, IV, 1-41.

Borsook (K.) et Dubnoff (J.W.). — The biological synthesis of hippuric acid *in vitro*. *J. biol. Chem.*, 1940, CXXXII, 307-324.

Borsook (H.), Mc Fadyen (D.A.) et Wasteneys (H.). — The substrate in peptic synthesis of protein. *J. Gen. Physiol.*, 1930, XIII, 295-306.

Borsook (H.) et Keighley. — The continuing metabolism of nitrogen in animals. *Proc. Roy. Soc.*, B, 1935, CXVIII, 488-520.

Borsook (H.) et Wasteneys (H.). — The enzymic synthesis of protein. IV. The effect of concentration on peptic synthesis. *J. biol. Chem.*, 1925, LXIII, 563.

Bradley (H.C.) et Morse (M.J.). — *J. biol. Chem.*, 1915, XXI, 209.
Bruyne (de). — *J. Physiol. et Pathol. Gen.*, 1924, XXII, 815.
Butkewitsch (W.). — Ueber das Vorkommen proteolytischer Enzyme in gekeimten Samen und ueber ihre Wirkung. I. II. *Ber. d. D. bot. Ges.*, 1900, XVIII, 185-189, 358-364. Ueber das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in gekeimten Samen und ueber seine Wirkung. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1901, XXXII, 1-53. *Tagebl. d.* 11. *Naturforscherkongr.*, Saint-Pétersbourg, 1902.
Collier (H.B.). — The problem of plastein formation. I. The formation of a plastein by papain. *Canad. J. Res. Sect. B. Chem. Sci.*, 1940, XVIII, 255-263. II. The chemical changes involved in plastein formation by papain and by pepsin. *Ibid.*, 272-280.
Courtois-Drilhon (A.). — Etudes biochimiques sur la métamorphose des Lépidoptères. *Thèse Sci.*, Paris, 1931.
Csonka (F.A.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, XXXIIX, 281.
Damodaran (M.) et Ananta-Narayanan (P.). — Enzymic proteolysis. I. Liberation of ammonia from proteins. *Biochem. J.*, 1938, XXXII, 1877-1889.
Danilewski. — Les forces organoplastiques de l'organisme (en russe). Charkow, 1886 ; cité d'après Effront.
Dickens (F.). — Interaction of halogenacetates and SH compounds. The reaction of halogenacetic acids with glutathione and cysteine. The mecanism of iodacetate poisoning of glyoxalase. *Biochem. J.*, 1933, XXVII, 1141-1151.
Dubuisson (M.). — Recherches sur les groupes ionisables de la myosine. II. La courbe de dissociation acide-base dans la formoltitration. *Arch. intern. Physiol.*, 1941, LI, 154-161.
Dunn (M.S.) et Weiner (J.G.). — Quantitative investigations of amino-acids and peptides. III. Apparent acid dissociation constants in aqueous formaldehyde solutions. *J. biol. Chem.*, 1937, CXVII, 381.
Eder (H.), Bradley (H.C.) et Belfer (S.). — The survival of cathepsin in autolysis. *J. biol. Chem.*, 1939, CXXVIII, 551-557.
Edlbacher (S.) et Leuthardt (Fr.). — Ueber den Einfluss der Ascorbinsaeure auf die Arginasewirkung. *Klin. Wochenschr.*, 1933, n° 47, 1843.
Effront (J.). — Les catalyseurs biochimiques. Dunod, Paris, 1914.
Elion (M.). — Ueber die Wirkung von Backhilfsmitteln auf die proteolytischen Enzyme des Weizenmehls. *Enzymol.*, 1937, III, 103-104.
Euler (H.v.). — *Naturw.*, 1933, XXI.
Euler (H.v.), Karrer (P.) et Zehender (F.). — Das Verhalten von Vitamin C (Ascorbinsaeure) und anderer Reduktone gegen katheptische und andere Enzyme. *Helv. Chem. Act.*, 1934, XVII, 157-162.
Fernbach (A.) et Hubert (L.). — Sur la diastase protéolytique du malt. *C.R. Ac. Sc.*, 1900, CXXX, 1783 ; CXXXI, 293.
Firdman (J.). — L'optimum thermique de l'action des enzymes en fonction de leur origine et de leur degré de pureté. *Ann. d. Physiol.*, 1938, XIV, 67-93.

Fischgold (H.). — The relation between the activity of urease and the oxydation-reduction potential. *Biochem. J.*, 1934, XXVIII, 406-410.

Fisher (E.A.). — Contributions to the study of the vegetable protease .*Biochem. J.*, 1919, XIII, 124-134.

Folley. — Note on the preparation and fractionation of the α-naphtyl-isocyanate compound of plastein. *Biochem. J.*, 1933, XXVII, 151-152.

Ford (W.R.) et Maiden (A.M.). — *J. Soc. Chimic. Ind.*, 1938, LVII, 278-281.

Frankel (M.) et Maimin (R.). — Natural activation of papain. *Nature*, 1937, CXL, 1015.

Frankel (M.), Maimin (R.) et Shapiro (B.). — Enzymic properties of natural papain. *Nature*, 1937, CXXXIX, 249.

Friedenwald (J.S.) et Stiehler (R.D.). — Circulation of the aqueous. VII. A mecanism of secretion of the intraocular fluid. *Arch. of Opht.*, 1938, XX, 760-786.

Fruton (J.S.) et Bergmann (M.). — On the proteolytic enzymes of animal tissues. I. Beef spleen. *J. biol. Chem.*, 1939, CXXX, 19-27. The specificity of pepsin. *Ibid.*, 1939, CXXVII, 627-641. The activation of papain. *Ibid.*, 1940, CXXXIII, 153-156.

Ganapathy (C.V.) et Sastri (B.N.). — Active group of papain. *Nature*, 1938, CXLII, 539. The nature of papain. *Biochem. J.*, 1939, XXXIII, 1175-1179.

Goldstein (B.). — Zur Biochemie der Gewebeproteinasen. *Enzymol.*, 1936, I, 256-267. Das Problem der Spezifitaet von Gewebeproteinasen (Kathepsin). *Enzymol.*, 1938, II, 193-202.

Goldstein (B.) et Gintsbourg (M.). — Proteinases (cathepsin) in tissues of the chicken embryo. *Enzymol.*, 1937, I., 369-372 ; *Biochem. J. Ukraine*, 1938, XI, 71.

Gorup-Besanez (V.). — Ueber das Vorkommen eines diastatischen und peptonbildenden Ferments in den Wickensamen. *Ber. d. D. chem. Ges.*, 1874, p. 1478-1480.

Grassmann (W.). — Zur Kenntniss des natuerlichen Papain-Aktivators. *Biochem. Zschr.*, 1935, CCLXXIX, 131-136.

Grassmann (W.), Dyckerhoff (H.) et v. Schoenebeck (O.). — Ueber natuerliche Aktivatoren und Hemmungskoerper proteolytischer Enzyme. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1930, CLXXXVI, 183.

Grassmann (W.), v. Schoenebeck (O.) et Eibeler (H.). — Ueber die Aktivierung tierischer und pflanzlicher Proteasen durch Glutathion. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1931, CLXXXXIV, 124-136.

Green (I.R.). — On the changes in the proteids in the seed which accompany germination. *Philos. Trans. Roy. Soc.* Londres, 1887, CLXXIIX B, 39.

Greenberg (D.) et Winnick (Th.). — Plant proteases. I. Activation, inhibition, reactions. — *J. biol. Chem.*, 1940, CXXXV, 761-773.

Grimmer (W.). — Zur Kenntniss der Wirkung der proteolytischen Enzyme der Nahrungsmittel. *Biochem. Zschr.*, 1907, IV, 80-98.

Guillaumie (M.), Fabre (M.) et Charles (G.). — Etudes biochimiques sur les constituants de la toxine *perfringens*. Activité de la toxine *perfringens* en fonction des phénomènes d'oxydation-réduction. *C.R. Soc. Biol.*, 1941, CXXXV, 909.

Haarmann (W.). — Zur Methodik der Bestimmung von Eiweissabbauprodukten. *Biochem. Zschr.*, 1938, CCIVC, 121-130.

Haehn (H.). — Autolyse. *Erg. d. Enzymfschg*, 1936, V, 117-154.

Haldane (J.B.S.). — Enzymes, London, 1930.

Hare (M.). — Tyramine-oxidase. *Biochem. J.*, 1928, XXII, 968.

Harlay (V.). — Du ferment protéolytique des graines en germination. *C.R. Ac. Sc.*, 1900, CXXXI, 623.

Harris (L.J.). — The titration of amino and carboxylic groups in amino-acids, polypeptides, etc. I-III. Investigations with aqueous solutions. *Proc. Roy. Soc. B*, 1923, VC, 442-484. IV-VI. Estimations in presence of formol and alcool. *Ibid.*, 500. The combination of proteins, amino-acids, etc. with acids and alcalis. II. Titration curves of amino-acids in presence of formaldehyde. *Ibid.*, 1928, CIV, 412-439.

Hellerman (L.). — Reversible inactivations of certain hydrolytic enzymes. *Physiol. Rev.*, 1937, XVII, 454-484.

Hellerman (L.) et Perkins (M.E.). — Activation of enzymes. II. Papain activity as influenced by oxydation-reduction and by the action of metal compounds. *J. biol. Chem.*, 1934, CVII, 241-255.

Henniger (A.). — Recherches sur les peptones. *C.R. Ac. Sc.*, 1878, LXXXVI, 1464.

Henriquez (V.) et Gjaldbaek (J.). — Untersuchungen ueber die Plasteinbildung. *Zschr. physiol. Chem.*, 1911, LXXI, 485-517.

Herrmann (J.) et Chain (A.).— Zur Kenntniss der Plasteine. *Zschr. physiol. Chem.*, 1912, LXXVII, 289.

Hesse (A.). — Ueber die Verwendung von Enzymen in der Industrie. II. Eiweissabbau und Proteasen. *Erg. d. Enzymfschg.*, 1934, III, 119-134.

Hofmeister (F.). — Ueber die Rueckbildung von Eiweiss aus Pepton. *Zschr. physiol. Chem.*, 1878, II, 206.

Holtz. — *Naturw.*, 1937, XXV, 14 et 251.

Itoh (R.). — Sur l'existence d'une substance qui contrôle l'action hydrolytique et synthétique de la lipase. *J. Biochem.* Japan, 1936, XXIII, 299-304.

Iwanoff (N.). — Ueber synthetische Prozesse der Hefeautolyse. *Biochem. Zschr.*, 1914, LXIII, 359-368. Ueber die Verwandlung stickstoffhaltiger Substanzen bei den Endphasen der Hefenautolyse. *Ibid.*, 1921, CXX, 1-24.

Jacoby. — *Biochem. Zschr.*, 1908, X, 231.

Janicki (J.). — Das Oxydations-Reduktionspotential der waessrigen Auszuege der keimenden Gerste. *Enzymol.*, 1937, IV, 107-110.

Joergensen (H.). — Ein Beitrag zur Beleuchtung der hemmenden Wirkung von Oxydationsmitteln auf proteolytische Enzymtaetigkeit. Ueber die Natur der Einwirkung von Kaliumbromat und analogen Stoffen auf die Backfaehigkeit des Weizenmehles. *Biochem. Zschr.*, 1935, CCLXXX, 1-37 ; 1935,

CCLXXXIII, 134-145. On the existence of powerful but latent proteolytic enzymes in wheat flour. *Cereal Chem.*, 1936, XIII, 346-355. Studies on the influence of chlorate, bromate, and iodate on the action of papain on casein. *C.R. Lab. Carlsberg* 1938, XXII (sér. chim.), 246-254.

Jowett (M.) et Quastel (J.). — *Biochem. J.*, 1933, XXVII, 486.

Karrer (P.) et Straus (W.). — Dihydropyridinverbindungen als Aktivatoren des Kathepsins. *C.R. Lab. Carlsberg*, série chim., 1938, XXII, 255-260.

Karrer (P.) et Zehender (F.). — Vitamin C (Ascorbinsaeure) als Aktivator katheptischer Enzyme. *Helv. Chem. Acta*, 1933, XVI, 701-703.

Kestner (O.). — The physiological significance of autolysis. *C.R. Lab. Carlsberg* (sér. chim.), 1938, XXII, 261-263.

Kleinmann (H.) et Werr (F.). — *Biochem. Zschr.* 1931, CCXLI, 108.

Klemen (R.) et Stucin (D.). — Zeitlicher Verlauf der Zuckerbildung in Weizenautolysaten. *Biochem. Zschr.*, 1939, CCC, 338-342.

Kostytschew (S.) et Brilliant (W.). — Die Synthese stickstoffhaltiger Stoffe im Macerationshefensaft. *Zschr. physiol. Chem.*, 1914, LXXXXI, 344-371.

Krassinsky (N.). — Ueber Oxydations-Reduktions-Potentiale der Zellen der hoheren Pflanzen. *Protoplasma*, 1936, XXV, 41.

Krebs (H.A.). — Ueber die Proteolyse der Tumoren. *Biochem. Zschr.*, 1931, CCXXXIIX, 174-196.

Kuehnau (J.). — Ueber den Mechanismus der Verknüpfung von Fett- und Kohlenhydratabbau in der Leber. (Ein Beitrag zur Kenntniss biologischer Redoxpotentiale). *Biochem. Zschr.*, 1931, CCXLIII, 14-50.

Kurajew. — Ueber die koagulierende Wirkung des Papayotins auf Peptonloesung. *Hofmeist. Beitr.*, 1901, I, 121; 1902, II, 411; 1903, IV, 476.

Langmuir (I.) et Wrinch (D.). — Nature of the cyclol bond. *Nature*, 1939, CXXXXIII, 49-52.

Laqueur (E.). — Ueber den Einfluss von Gasen, im besonderen von Sauerstoff und Kohlensaeure, auf die Autolyse. *Z. physiol. Chem.*, 1912, LXXIX, 82-129.

Lawrow. — Ueber den Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung des Eiweisses. *Thèse*, Saint-Pétersbourg, 1897.

Levene (P.A.) et van Slyke (D.D.). — Ueber Plastein. *Biochem. Zschr.*, 1908, XIII, 461.

Lieben (F.) et Jesserer (H.). — Zur Frage der Einwirkung ultravioletter Strahlen auf Pepton und Proteinloesungen. *Biochem. Zschr.*, 1935, CCLXXV, 367-372.

Linderstroem-Lang (K.). — Titrimetrische Bestimmung von Aminostickstoff. *C.R. Lab. Carlsberg*, 1927, XVII ; *Zschr. physiol. Chem.*, 1928, CLXXIII, 32-50. Les substances protéiques et les enzymes protéolytiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1940, XXII, 339-350.

Lominski (I.). — Inactivation du bactériophage par oxydation ; réactivation par l'acide ascorbique. *C.R. Soc. Biol.*, 1935, CXIX, 952 et 1345.

Luck (J.M.). — Liver proteins. *C.R. Lab. Carlsberg* (série chimique), 1938, XXII, 321.

Lundin (H.). — Ein Beitrag zur Kenntniss der proteolytischen Enzyme des Malzes. *Biochem. Zschr.*, 1922, CXXXI, 193-218.

Maeda (S.). — Sur la nature chimique de la papaïne. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1937, XII, 319-325.

Maillard (L.C.). — Genèse des matières protéiques et des matières humiques. *Thèse Sc.*, Paris, 1913 (Masson).

Martens (R.). — Considérations sur le dosage séparé des acides aminés et des polypeptides dans les produits de digestion des protéines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, IX, 454-482.

Masaki (K.) et Ikkatai (T.). — *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1933, VII, 233-238.

Maschmann (E.). — Beitraege zur Aktivierung pflanzlicher Proteinasen. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1934, CCXXVIII, 141-186. Ueber intracellulaere Proteinasen. XV. Bemerkungen zur Inaktivierung der Proteinasen durch Jodessigsaeure. *Biochem. Zschr.*, 1935, CCLXXIX, 225-228. Ueber Bakterienproteasen. I. *Ibid.*, 1937, CCLXXXXIV, 1-33. Ueber Bakterienproteasen. IX. Die Anaerobiase der Gasbranderreger. *Ibid.*, 1938, CCIIIC, 284-296. Ueber Bakterienproteasen. XII. Zur Kenntniss der Dipeptidasen anaerober Bakterien. *Ibid.*, 1939, CCCII, 332-368.

Maschmann (E.) et Helmert (E.). — Ueber die Aktivierung des Papains durch Vitamin C (Ascorbinsaeure) oder Vitamin C-Eisen. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1934, CCXXIV, 56-60. Ueber den Einfluss von Eisenverbindungen auf proteolytische und peptolytische Vorgaenge. *Ibid.*, 1934, CCXXXI, 51. — Ueber intracellulaere Proteinasen. XVI. Weitere Beitraege zur Aktivierung und Hemmung des Papains. *Biochem. Zschr.*, 1935, CCLXXX, 184-203. Ueber intracellulaere Proteinasen. XIV. Aktivierung und Hemmung des Papains durch Ferricyankalium. *Ibid.*, 1935, CCLXXIX, 213-224.

Mauthner (J.). — Ueber Cystin. *Zschr. physiol. Chem.*, 1912, LXXVIII 28-36.

Mayer (M.E.). — The separation of cathepsin from malignant and normal rat tissue. *J. biol. Chem.*, 1939, CXXXI, 127-134.

Mayer (M.E.) et Voegtlin (C.). — The optimal conditions for the synthesis of protein in fibrin-papain-glutathione digests. *Enzymol.*, 1939, VI, 219-224.

Mendel (L.B.) et Blood (A.F.). — *J. biol. Chem.*, 1910, VIII, 177.

Mesnil (F.). — Recherches sur la digestion intracellulaire et les diastases des Actinies. *Ann. Inst. Past.*, 1901, XV, 352.

Miller (L.). — Digestion of crystallin lactogloculin by criystallin trypsin and chymotrypsin. *C.R. Lab. Carlsberg*, 1939, XXIII, 45-53.

Michaelis (L.) et Davidsohn (H.). — Die isoelektrische Konstante des Pepsins. *Biochem. Zschr.*, 1910, XXVIII, 1.

Mirsky (A.) et Anson (M.L.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1932, XXVIII, 170 ; *J. Gen. Physiol.*, 1935, XVIII, 307.

Moerner (C. Th.). — Untersuchung der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. *Zschr. physiol. Chem.*, 1894, XVIII, 61-106.

Morgan (E.J.) et Friedmann (E.). — Interaction of maleic acid with thiol compounds. *Biochem. J.*, 1938, XXXII, 733-742. Maleic acid as inhibitor of enzyme reactions induced by SH-compounds. *Ibid.*, 862-870.

Morse (W.). — Factors involved in the atrophy of the organs of the larval Frog. *Bull. Biol.*, 1918, XXXIV.

Mothes (K.). — Die natuerliche Regulation des pflanzlichenEiweiss-stoffwechsels. *Ber. d. D. bot. Ges.*, 1933, LI, 31-46 ; *Naturw.*, 1933, XXI, 883.

Mounfield (J.D.). — The proteolytic enzymes of sprouted wheat. *Biochem. J.*, 1936, XXX, 549-557 ; 1938, XXXII, 1675-1684.

Mouton (H.). — Recherches sur la digestion ches les Amibes et sur leur diastase intracellulaire. *Ann. Inst. Past.*, 1902, XVI, 457-509.

Mystkowski (E.). — Proteases and Ontogenesis. I. Cathepsin in the chick embryo. *Biochem. J.*, 1936, XXX, 765-769.

Neber (M.). — Ueber die oxydative Desaminierung von Amino-saeuren. *Zschr. physiol. Chem.*, 1936, CCXL, 59-69.

Nicolle (M.). — Une conception générale des anticorps et de leurs effets. III. Les anticorps normaux. *Ann. Inst. Pasteur* 1908, XXII, 237. L'autolyse. Etude de biologie générale. *Ann. Inst. Pasteur*, 1913, XXVII, 97.

Nord (F.F.). — Zum Mechanismus der Enzymwirkung unter beson-derer Beruecksichtigung der Kryolyse. Enke, Stuttgart, 1933.

Nordmann (J.) et Reiss (P.). — Le potentiel de platine et l'équi-libre d'oxydation-réduction du cristallin. *C.R. Soc. Biol.*, 1933, CXII, 812-814. Le potentiel de platine du cristallin dans la cataracte. *C.R. Soc. Biol.*, 1933, CXIV, 12-13. Le problème physico-chimique de l'opacification du cristallin. *Docum.Ophtal.*, 1938, I, 461-482.

Nuerenberg. — *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1904, IV, 543.

Ogata (A.), Morimoto (K.) et Mori (F.). — *J. Pharm. Soc. Japan*, 1939, LIX, 171-173.

Okunew (N.). — Ueber die Rolle des Labfermentes bei den Assi-milationsprozessen des Organismus. *Thèse*, Saint-Pétersbourg, 1907. Ueber einige physiko-chemische Erscheinungen waehrend der Regeneration. IV. Ueber das Oxydations-Reduktions-potential der Gewebe einer regenerierenden Axolotlextremi-taet. *Biochem. Zschr.*, 1932, CCLV, 387-393.

Oparin (A.). — Die Wirkung der Fermente in der lebenden Zelle. *Erg. d. Enzymf.*, 1934, III, 57-72.

Orechowitsch (W.N.). — Zur Frage ueber die Aktivierung der Proteolyse in den regenerierenden Geweben. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1934, CCXXIV, 61. Ueber die Wirkungsbedingungen des Kathepsins in den Geweben regenerierender Organe von Amphibien. *Biochem. Zschr.*, 1936, CCLXXXVI, 285-289.

Palladin (V.). — *Thèse*, 1895.

Pantschenko, Jurewicz (W.) et Kraut (H.). — Ueber Struktur und Eigenschaften der Esterasen. II. Ein Zusammenhang zwischen Ascorbinsaeure und Leberesterase. *Biochem. Zschr.*, 1936, CCLXXXV, 407-419.

Pekelharing (C.) et Ringer (W.). — Zur elektrischen Ueberfuehrung des Pepsins. *Zschr. physiol. Chem.*, 1911, LXXV, 282.

Popovici (N.) et Radulescu (A.). — Une nouvelle méthode pour le dosage des acides aminés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, XX, 73-81.

Pringsheim (H.), Borchadt (H.) et Huffer (H.). — Ueber Glutathion als Aktivator der fermentativen Staerkeverzuckerung. *Biochem. Zschr.*, 1931, CCXXXVIII, 477.

Prokoshev (S.M.). — The specificity of protease in seeds and sprouts of a number of crops. *Bull. applied Bot.* (U.S.R.R.), 1936, sér. III, nº 14.

Purr (A.). — The influence of vitamin C (ascorbic acid) on plant and animal amylases. *Biochem. J.*, 1934, XXVIII, 1141-1148. Studies on the reversible inactivation of papain and cathepsin. *Ibid.*, 1935, XXIX, 5-12.

Rapkine (L.). — Sur l'action de l'acide monoiodacétique sur le glutathion et la cystéine. Sur l'action de l'acide monoiodacétique sur les groupements sulfhydrilés liés aux protéines. *C.R. Soc. Biol.*, 1933, CXII, 790 et 1294. Sulphydryl groups and enzymic oxido-reduction. *Biochem. J.*, 1938, XXXII, 1729-1739.

Rapkine (L.) et Trpinac (P.). — Le rôle des groupements sulfhydrilés des protéines dans l'activité des déshydrases. *C.R. Soc. Biol.*, 1939, CXXX, 1516.

Redslob (E.) et Reiss (P.). — Le potentiel d'oxydation-réduction du corps vitré. *C.R. Soc. Biol.*, 1929, CII, 1060-1062.

Regno (F. del). — Azione della cisteina, de Fe++ e del sistema cisteina-Fe++ sulla fosfatasi alcalina. *Arch. di Sc. Biol.*, 1938, XXIV, 492-536.

Reiss (P.). — Le pH intérieur cellulaire. 132 p., 1926, Paris, *Presses Univ.*

Le potentiel de platine correspondant à l'inactivation du pouvoir protéolytique de la papaïne par les oyxdants. *C.R. Soc. Biol.*, 1935, CXX, 908-910.

Conditions d'oxydation-réduction dans lesquelles les produits de digestion papaïnique de la gélatine subissent, en présence de papaïne, une condensation. *C.R. Soc. Biol.*, 1936, CXXII, 568-570.

Expériences au sujet du déterminisme physico-chimique de l'autolyse des tissus d'*Arenicola marina* L. *Tr. Stat. biol. Wimereux*, 1938, XIII, 625-628.

Une burette à mise au zéro automatique. *Bull. Soc. chim. France*, 5e série, 1938, V, 569-571.

L'action du potentiel d'oxydation-réduction du milieu sur la protéolyse de la pulpe de rate. *C.R. Soc. Biol.*, 1938, CXXVIII, 1197-1200.

L'action du potentiel d'oxydation-réduction du milieu sur la protéolyse de l'Orge. *C.R. Soc. Biol.*, 1939, CXXXI, 539-541.

L'action du potentiel d'oxydation réduction sur la protéolyse dans le cristallin et le corps vitré. *Soc. Phys. Biol. Fr.*, 1941, nº 44, p. 39.

Mesures de potentiel d'oxydation-réduction dans la graine d'Orge en germination. *Soc. Phys. Biol. Fr.*, 1941. nº 47.

Influence du potentiel d'oxydation-réduction sur l'activité des systèmes d'enzymes protéolytiques intracellulaires animaux et végétaux et de la papaïne. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, XXIII, 1163-1173.

Influence du potentiel d'oxydation-réduction sur l'autolyse protéique. *Soc. Phys. Biol. Fr.*, 1942, nº 52.

Reiss (P.) et Nordmann (J.). — Le potentiel de platine et l'équilibre d'oxydation-réduction du cristallin et de l'humeur aqueuse d'yeux normaux et cataractés. *Arch. Phys. Biol.*, 1935, XII, 15-36.

Reiss (P.) et Vellinger (E.). — Recherches potentiométriques sur le pH intérieur du muscle. *C.R. Soc. Biol.*, 1926, XCV, 704.

Robertson (T.B.). — Note on the synthesis of a protein through the action of pepsin. *J. biol. Chem.*, 1907, III, 95-99.

The physical chemistry of proteins. Longmans, London, 1918.

Robertson (T.B.) et Brailsford (T.). — *J. biol. Chem.*, 1907, III, 95-99.

Roche (A.) et Roche (J.). — Microdosage électrométrique de l'azote formoltitrable à l'aide de l'électrode d'antimoine. *Arch. Phys. Biol.*, 1931, IX, 273-276. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, XIII, 835-840.

Roche (J.) et Martin-Poggi (R.). — Recherches sur l'ossification. IX. Rôle de la vitamine C et de la phosphatase dans la formation de la substance osseuse, en particulier dans les cals de fracture. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, XXIII, 1534-1545.

Rona (P.) et Chrometzka (Fr.). — Beitraege zur Frage der fermentativen Eiweisssynthese. *Biochem. Zschr.*, 1927, CLXXXIX, 249-264.

Rondoni (P.). — Proteolysis in tumours. *Biochem. J.*, 1932, XXVI, 1477-1487.

Rondoni (P.) et Pozzi (L.). — Ueber den Einfluss reduzierender und oxydierender Behandlung auf die Funktion der Organkatepsine. *Zschr. physiol. Chem.*, 1933, CCXIX, 22-30. Ueber den Einfluss des Wasserstoffsuperoxyds auf die Faellbarkeit der Proteine. *Zschr. physiol. Chem.*, 1935, CCXXXV, 81-90.

Rosenbohm (A.). — *Biochem. Zschr.*, 1937, CCLXXXIX, 283.

Rubel (W.M.). — Ueber den Zusammenhang von Glykolyse und Proteolyse der Gewebe. *Biochem. Zschr.*, 1936, CCLXXXIII, 180-189.

Rubin (B.A.) et Arcikhowskaja (E.V.). — On the relation between oxydation and hydrolysis in a living cell. *C.R. Ac.* U.R.S.S., 1937, XVII, 135.

Salaskin (A.) et Solowyew (L.). — Ueber Beeinflussung der Arginase durch Sauerstoff, Kohlensaeure und Zysteïn. *Zschr. physiol. Chem.*, 1931, CIC, 259.

Saviano (M.). — Ricerche sugli enzimi digestivi dell' *Anemonia sulcata*. *Arch. di Science biol.*, 1936, XXII, 205-218.

Sawano (E.). — Contributions to the knowledge on the digestive enzymes in marine invertebrates. I. Proteolytic enzymes in *Polypus vulgaris* Lamarck. *Sc. Rep. Tokyo Bunr. Daig.*, 1935, II, 101-126. Studies on the proteolytic system in the Ciliata *Parameciun caudatum. Ibid.*, 1938, III, 221-242.

Sawjalow. — Zur Theorie der Eiweissverdauung. *Pflueg. Arch.*, 1901, LXXXV, 171. *Zschr. physiol. Chem.*, 1907, LIV, 119.

Schaeffer (G.) et Le Breton (E.). — L'action dynamique spécifique des protides. *Actual. Scient.*, 1938, nº 641 (Hermann, Paris).

Schmidt (C.L.A.). — The chemistry of the aminoacids and proteins. Springfield, 1938.

Schoeberl (A.) et Fischer (M.). — Ueber Schwefelgehalt und Aktivierbarkeit von Papain. *Biochem. Zschr.*, 1939, CCCII, 310-331.

Schuermeyer (A.). — *Arch. Physiol.*, 1925, CCVIII, 595.

Schuetzenberger (P.). — Recherches sur la synthèse des matières albuminoïdes et protéiques. *C.R. Ac. Sc.*, 1888, CVI, 1407. Essai sur la synthèse des matières protéiques. *C.R. Ac. Sc.*, 1891, CXII, 198.

Shwachman (H.), Hellerman (L.) et Cohen (B.). — On the reversible inactivation of pneumococcal hemolysin. *J. biol. Chem.*, 1934, CVII, 256-265.

Simon (F.). – Autolyse normaler und pathologischer Nieren. *Biochem. Zschr.*, 1914, LXVII, 483-501.

Sizer (J.W.), et Tytell (A.A.). — The activity of cristalline urease as a function of oxydation-reduction potential. *J. biol. Chem.*, 1941, CXXXVIII, 631-642.

Soerensen (S.P.L.). — Enzymstudien. I. Ueber die quantitative Messung proteolytischer Spaltungen. Die Formoltitrierung. *Biochem. Zschr.*, 1907, VIII, 45-101.

Stern (K.G.). — Ueber die autolytische Wirksamkeit der tierischen Gewebsproteinasen und ihre Beeinflussung durch Schwermetalle. *Biochem. Zschr.*, 1931, CCXXXIV, 116-138.

Strain (H.) et Linderstroem-Lang (K.). — The reputed synthesis of protein by aeration of protein-proteinase digests. *C.R. Lab. Carlsberg*, 1938, XXIII, 11-15. *Enzym.*, 1937, V, 86-88; 1939, VII, 241-244.

Sumner (J.) et Poland (L.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1933, XXX, 553.

Taylor. — On the synthesis of a protein through action of trypsin. *J. biol. Chem.*, 1907, III, 87-94.

Terroine (E.F.) et Lauresco (C.). — La libération de l'ammoniaque au cours des protéolyses enzymatiques. *Arch. Intern. Physiol.*, 1935, XLII, 205-222.

Thiesse (X.). — De la prévision des réactions d'oxydation et de réduction en chimie minérale. *Thèse Sc.*, Nancy, 1937.

Tono (M.). — *J. Biochem. Japan*, 1939, XXIX, 361-370.

Uchimara (Y.). — *J. Biochem. Japan*, 1937, XXV, 207-217.

Ussing (H.H.). — Use of amino-acids containing deuterium to follow protein production in organism. *Nature*, 1938, CXLII, 399-400.

Vlès (F.). — Considérations théoriques sur le point isoélectrique des ampholytes: leur application à la formation de complexes. *Arch. Phys. Biol.*, 1925, IV, 228-254. Note sur l'électrode d'antimoine. II. Montage pratique en différentiel. *Ibid.*, 1927, VI, 92-96. Recherches sur les propriétés physico-chimiques des électrolytes. II. L'interprétation des relations entre les constantes électrochimiques, le spectre infra-rouge et les propriétés réactionnelles. *Ibid.*, 1936, XIII, 88-107. Notes techniques d'analyse spectrale. *Ibid.*, 1937, XIV, 1-81.

Voegtlin (C.) et Maver (M.E.). — *U.S. Treas. Dept. Publ. Health Rep.*, 1932, XLVII, 711.

Voegtlin (C.), Maver (M.E.) et Johnson. — *J. of Pharmacol.*, 1933, IIL, 241.

Wagner-Jauregg (Th.) et Moller (C.). — *Zschr. physiol. Chem.*, 1935, CCXXXVI, 222.

Waldschmidt-Leitz (E.), Conrath (O.) et Gloeditsch (J.). — *Naturw.*, 1937, XXV, 60.

Waldschmidt-Leitz (E.) et Deutsch (W.). — Ueber die proteolytischen Enzyme der Milz. *Zschr. physiol. Chem.*, 1927, CLXVII, 285.

Waldschmidt-Leitz (E.) et Purr (A.). — Ueber Zookinase. *Zschr. physiol. Chem.*, 1931, CIIC, 260-266.

Waldschmidt-Leitz (E.), Weil (L.) et Purr (A.). — Ueber die Steuerung des intracellulaeren Umsatzes von Eiweiss und Kohlenhydrat durch Sulfhydryl. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1933, CCXV, 64.

Weil (L.) et Russell (M.A.). — Proteolytic activity of plasma during tumor or embryonic growth in Rats. *J. biol.Chem.*, 1938, CXXVI, 245-254.

Weis (F.). — Ueber das proteolytische und ein eiweisscoagulierendes Enzym in keimender Gerste. *Zschr. f. physiol. Chem.*, 1900-1901, XXXI, 79-97.

Willstaetter (R.), Graser (J.) et Kuhn (R.). — Zur Kenntniss des Invertins. *Zschr. physiol. Chem.*, 1922, CXXIII, 1.

Willstaetter (R.) et Grassmann (W.). — Ueber die Aktivierung des Papains durch Blausaeure. *Zschr.f. physiol. Chem.*, 1924, CXXXIIX, 184.

Willstaetter (R.), Grassmann (W.) et Ambros (O.). — Blausaeureaktivierung und Hemmung pflanzlicher Proteasen. *Zschr. physiol. Chem.*, 1926, CLI, 286.

Willstaetter (R.) et Waldschmidt-Leitz (E.). — Ueber Ricinuslipase. *Zschr. physiol. Chem.*, 1924, CXXXIV, 161.

Wurmser (R.). – Signification des potentiels d'oxydo-réduction pour les réactions enzymatiques. *Erg. d. Enzymforsch.*, 1932, I. La signification biologique des potentiels d'oxydo-réduction. *Biol. Reviews*, 1932, VII, 350-381. L'électroactivité dans la chimie des cellules. *Act. Scient.*, nº 244, Hermann, Paris, 1935.

Wurtz (Ch.A.) et Bouchut (E.). — Sur le ferment digestif du *Carica papaya*. *C.R. Ac. Sc.*, 1879, LXXXIX, 425-429.

Zaleski (W.). — Beitraege zur Kenntniss der Eiweissbildung in reifenden Samen. *Ber. d. D. bot. Ges.*, 1905, XXIII, 126-133. Zur Kenntniss der proteolytischen Enzyme der reifenden Samen. *Ibid.*, 133-142.

# TABLE DES MATIÈRES


INTRODUCTION.

Le problème posé ..... 9

TECHNIQUE.

Choix des ferments ..... 17
Le substrat ..... 19
Technique de l'autolyse ..... 21
Mesure de l'autolyse ..... 23
Caractéristiques du milieu ..... 31

ETUDE DE DIFFÉRENTS SYSTÈMES PROTÉOLYTIQUES.

*Résultats expérimentaux.*

Papaïne ..... 35
Historique ..... 35
Expériences personnelles ..... 39

Graine d'Orge ..... 43
Paroi d'*Actina equina L.* ..... 49
Paroi musculaire d'*Arenicola marina L.* ..... 53
Substance musculaire de la Tanche ..... 56
Pulpe de rate de veau ..... 58
Cristallin et corps vitré de veau et de Bœuf ..... 64
Action d'extraits d'hépatopancréas sur la gélatine ..... 69
Pepsine ..... 70

*Discussion.*

Discussion de la technique ..... 73
Discussion des résultats du point de vue physico-chimique. 78
Discussion de la signification biologique des résultats .. 83

ESSAIS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE « IN VITRO ».

*Historique.*

Faits expérimentaux ..... 89
Influence de l'équilibre d'oxydation-réduction du milieu. 97

*Expériences personnelles.*

Technique générale ..... 99
Expériences avec la papaïne ..... 100
Expériences avec d'autres enzymes ..... 106

*Discussion.*

Point de vue physico-chimique ..... 115
Point de vue biologique ..... 118

CONCLUSIONS ..... 121

BIBLIOGRAPHIE ..... 123

# DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

**Résultats modernes sur la structure des protéines.**

**Le « potentiel d'arrêt » de la vie des organismes.**

Vu et approuvé :

Clermont, le 1er juin 1942.

*Le Doyen de la Faculté des Sciences,*

A. DANJON,

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Clermont, le 3 juin 1942

*Le Recteur de l'Académie de Strasbourg*
*Président du Conseil de l'Université,*

A. TERRACHER

*Imp. Générale, J. de Bussac, 2, cours Sablon, Clermont-Ferrand*